

Aus dem Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung

Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rolf Müller

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg



Spindelcheckpoint-Inhibierung als neuer Therapieansatz in der molekularen Onkologie

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Verena Janina Schneider (geb. Grodd)

aus Siegen

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
17.02.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: PD Dr. Holger Bastians

1. Koreferent: Prof. Dr. Aigner

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	<i>Zusammenfassung</i>	1
2	<i>Einleitung</i>	2
2.1	Tumorgenese	2
	Definition und Entstehung von Krebs.....	2
2.2	Der eukaryotische Zellzyklus	3
	Steuerung des Zellzyklus	3
	Phasen der Mitose	4
2.3	Spindelcheckpoint	5
	Allgemeine Definition von Checkpoints.....	5
	Definition des Spindelcheckpoints.....	6
	Trennung der Schwesterchromatiden in der Mitose	6
	Mechanismus des Spindelcheckpoints	8
	Sensormechanismen des Spindelcheckpoints	10
	Timing-Funktion von Mad2 und BubR1	11
	Spindelcheckpoint-Komponenten im Mausmodell	11
2.4	Krebstherapie – Gegenstand der Forschung	12
	Konzept der Krebstherapie	12
	Wirkmechanismen klassischer Chemotherapeutika.....	12
	Nebenwirkungen der Chemotherapie.....	14
	Strahlentherapie verursacht DNA-Schäden	14
	Selektivität der Chirurgie.....	15
2.5	Zielgerichtete molekulare Krebstherapie	15
	Klassische Krebstherapie im Vergleich zur „targeted therapy“	15
	„Small molecule inhibitors“ bieten Möglichkeit zur Inhibierung	16
	siRNA senkt die Expression der Proteinmenge	16
	Einsatz von spezifischen Antikörpern zur Inhibierung von Zielmolekülen.....	17
2.6	Mitose als therapeutische Zielstruktur	18
	Klassische Chemotherapeutika mit Wirkung auf die Mitose	18
	Mechanismen der Apoptose.....	18
	Funktion des Spindelcheckpoints ist essentiell für die Wirkung von Taxol	19
	Chemotherapieresistenz	19
	„Small molecules“ mit Wirkung auf die Mitose	20
3	<i>Zielsetzung der Arbeit</i>	22
4	<i>Ergebnisse</i>	23
4.1	Inaktivierung des Spindelcheckpoints	23
	Nachweis der Checkpoint-Inaktivierung durch FACS-Analyse	23
	Spindelcheckpoint-Inaktivierung: Abbau mitotischer Proteine	26
	Spindelcheckpoint-Inaktivierung bei Proteasom-Blockade	28
	Gö6976 induziert eine vorzeitige Chromosomentrennung	28
4.2	Phänotypen einer pharmakologischen Spindelcheckpoint-Inhibierung	31
	Gö6976-Behandlung induziert keine Kernanomalien in Form von Multinuklei	31
	Beschleunigung der Mitose durch Behandlung mit Gö6976	32
	Gö6976 induziert Chromosomen-Aufreihungsdefekte in der Mitose	34
	Gö6976 induziert transienten Arrest.....	34
4.3	Untersuchung der molekularen Zielstruktur von Gö6976	35
	Kinase-Assay	35
	Phosphorylierungsstatus der Checkpoint-Kinasen.....	36
	Gö6976 induziert eine Delokalisation der Checkpoint-Kinasen	38

5	<i>Diskussion</i>	39
	Inaktivierung des Spindelcheckpoints	39
5.1	Die Suche nach dem Zielprotein von Gö6976	39
	Ausschluss von CDK1 und Chk1 als Zielstruktur von Gö6976.....	39
	BubR1 (Bub1) als mögliche Zielstruktur von Gö6976	40
	Aurora-Kinasen werden durch Gö6976 inhibiert.....	42
	Mps1-Kinase wird nicht durch Gö6976 gehemmt	42
	Verifizierung des Zielmoleküls durch einen Kinase-Assay	44
5.2	Phänotypen erzeugt durch Behandlung mit Gö6976	45
	Behandlung mit Gö6976 induziert keine Multinuklei.....	45
	Induktion eines transienten mitotischen Arrests durch Gö6976	45
	Gö6976 induziert Aufreihungsdefekte in der Mitose.....	46
5.3	Spindelcheckpoint-Hemmung als molekulare Krebstherapie	46
	Wirkung auf chemotherapieresistente Krebszellen.....	46
	Spezifische Wirkung von Gö6976 in der Mitose als Therapievorteil	47
	Synergismus von Gö6976 und Taxol.....	48
	Nachteile von Gö6976 in der Tumorthherapie.....	48
	Weiterentwicklung von Gö6976	48
5.4	Fazit	49
6	<i>Material und Methoden</i>	50
6.1	Material	50
	Geräte.....	50
	Chemikalien, Lösungen, Medien	52
6.2	Methoden	55
	Zellkultur	55
	Passagieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	55
	Chromosomen-Spreitungs-Analyse	56
	FACS-Analyse	57
	Herstellung von Zelllysaten	58
	Quantifizierung von Proteinen	58
	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	59
	Probenaufbereitung	59
	Western-Blotting.....	59
	Herstellung superkompetenter <i>Escherichia coli</i> DH5 α	60
	Transformation von <i>Escherichia coli</i> DH5 α	61
	Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i>	61
	Transfektion von Säugerzelllinien	61
	Immunfluoreszenz-Analysen	61
	Immunopräzipitation.....	62
	Kinase-Assay	63
7	<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	65
8	<i>Literaturverzeichnis</i>	67

1 Zusammenfassung

Krebszellen sind charakterisiert durch die Deregulation des Zellzyklus und durch das Versagen von Zellzyklus-regulierenden Kontrollmechanismen, die auch als Checkpoints bezeichnet werden. Im Zentrum dieser Arbeit steht der Spindelcheckpoint, der die korrekte Aufteilung der Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen in der Mitose kontrolliert. Die Funktion des Spindelcheckpoints ist in vielen Tumoren gestört und diese Funktionsstörung führt zu einer Resistenz der Tumoren gegenüber spindelschädigenden Chemotherapeutika. Der Inhibitor Gö6976, der in dieser Arbeit charakterisiert werden soll, ist in der Lage den Spindelcheckpoint zu inaktivieren und daher ist Gö6976 aus zwei verschiedenen Perspektiven heraus interessant. Zunächst ist ein spezifischer Inhibitor des Spindelcheckpoints von großem Nutzen für die Forschung als Instrument zur weiteren Aufklärung der Spindelcheckpoint-Signalkaskade. Andererseits könnte Gö6976 durch gezielte Hemmung des Spindelcheckpoints zur Entwicklung eines neuen Therapiekonzepts zur Behandlung chemotherapieresistenter Tumoren genutzt werden.

Es konnte durch FACS-Analyse, Westernblot-Analyse und Chromosomen-Spreitung gezeigt werden, dass Gö6976 den Spindelcheckpoint inaktiviert. Die Untersuchungen ergaben, dass die Spindelcheckpoint-Inaktivierung durch Gö6976 von einem Proteasom-abhängigen Abbau der mitotischen Proteine Securin und Cyclin B begleitet wird.

Weiterhin konnten folgende Phänotypen dem Inhibitor Gö6976 zugeordnet werden: Gö6976 beschleunigt den zeitlichen Ablauf der Mitose, induziert eine vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden („vorzeitige Anaphase“) und es wurden Chromosomen-Aufreihungsdefekte festgestellt. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass Gö6976 keine Multinuklei induziert, ein Phänotyp, der sonst häufig mit Spindelcheckpointdefekten assoziiert ist. Der Vergleich dieser Phänotypen mit denen, die durch Hemmung oder Reduktion der Proteinmengen von Spindelcheckpoint-Komponenten (Bub1, BubR1, Mad1, Mad2, Mps1 oder Aurora B) induziert werden, zeigt große Ähnlichkeiten. Weitere Experimente zur Identifikation des Zielmoleküls von Gö6976 wurden durchgeführt. In diesem Kontext wurde eine Dephosphorylierung von Bub1 und Mps1 beobachtet und es konnte gezeigt werden, dass Gö6976 zu einer Delokalisation der Checkpoint-Kinasen Bub1 und BubR1 vom Kinetochor führt.

2 Einleitung

2.1 Tumorgenese

Definition und Entstehung von Krebs

In den Industrienationen ist Krebs die zweithäufigste Todesursache nach den kardiovaskulären Erkrankungen. 7,6 Millionen Menschen starben laut WHO (World Health Organisation) im Jahr 2005 an Krebs (WHO 2006). Der Begriff „Krebs“ umfasst mehr als hundert Erkrankungen, die jedoch eine wesentliche Eigenschaft gemeinsam haben: Es handelt sich um körpereigene, entartete Zellen. Die sechs Grundmerkmale von Tumoren nach Hanahan und Weinberg umfassen folgende Eigenschaften (Hanahan und Weinberg 2000): 1.) Tumorzellen vermehren sich unkontrolliert und unabhängig von positiven Wachstumssignalen. 2.) Sie sind darüber hinaus immun gegen inhibitorische Wachstumssignale, wie z.B. gegen das Signal der Kontaktinhibition. Bei Kontaktinhibition hemmen sich die Zellen unter physiologischen Bedingungen aufgrund von zu hoher Zelldichte gegenseitig in ihrem Wachstum. Eine Voraussetzung für die hohe Proliferationsrate von Tumorzellen ist 3.) ein unbegrenztes Potenzial zur Replikation. Für die massive Größenzunahme eines Tumors spielt jedoch nicht nur die Proliferationsrate eine wichtige Rolle, sondern auch 4.) die Fähigkeit der Tumorzellen, die Apoptose zu umgehen. Die Apoptose ist ein genetisch determiniertes Programm, das z.B. im Fall einer irreparablen Beschädigung der Zelle zur Selbstelimination gestartet wird. In späteren Stadien der Tumorentwicklung sind Tumorzellen 5.) in der Lage, die Grenzen ihres natürlichen Gewebeverbands zu durchbrechen. Nachbarorgane können so infiltriert werden und über die Blut- und Lymphgefäße gelangen die Tumorzellen in weiter entfernte Organe. Diesen Prozess bezeichnet man als Metastasierung. Schließlich ist 6.) die Induktion von Angiogenese, also die Einsprossung neuer Blutgefäße in den Tumor, für die Größenzunahme essentiell, um eine ausreichende Zufuhr von Nährstoffen und Sauerstoff zu erreichen (Hanahan und Weinberg 2000). Hanahan und Weinberg postulieren, dass diese sechs Eigenschaften in einem Stufenprozess durch genetische Veränderungen akkumulieren müssen, damit es zur Entstehung eines malignen Tumors kommt.

2.2 Der eukaryotische Zellzyklus

Steuerung des Zellzyklus

Krebszellen zeichnen sich durch eine erhöhte Wachstumsrate aus. Wichtige Ursachen für die erhöhte Proliferationsrate sind eine Fehlsteuerung des Zellzyklus und ein Versagen der Zellzyklus-regulierenden Kontrollmechanismen.

Der Zellzyklus besteht aus vier Phasen. Die beiden wichtigsten Phasen des Zellzyklus sind die S-Phase, in der die Replikation der DNA stattfindet und die M-Phase (bestehend aus Mitose und Zytokinese), in der die Trennung der Chromosomen und die Zytokinese erfolgen. Dazwischen befinden sich die so genannten *Gap-Phasen* G_1 , in der die Zelle wächst, und G_2 , in der eine Vorbereitung auf die Mitose stattfindet (Alberts *et al.* 2004). Darüber hinaus kann die Zelle in einen Ruhezustand gehen, der als G_0 bezeichnet wird.

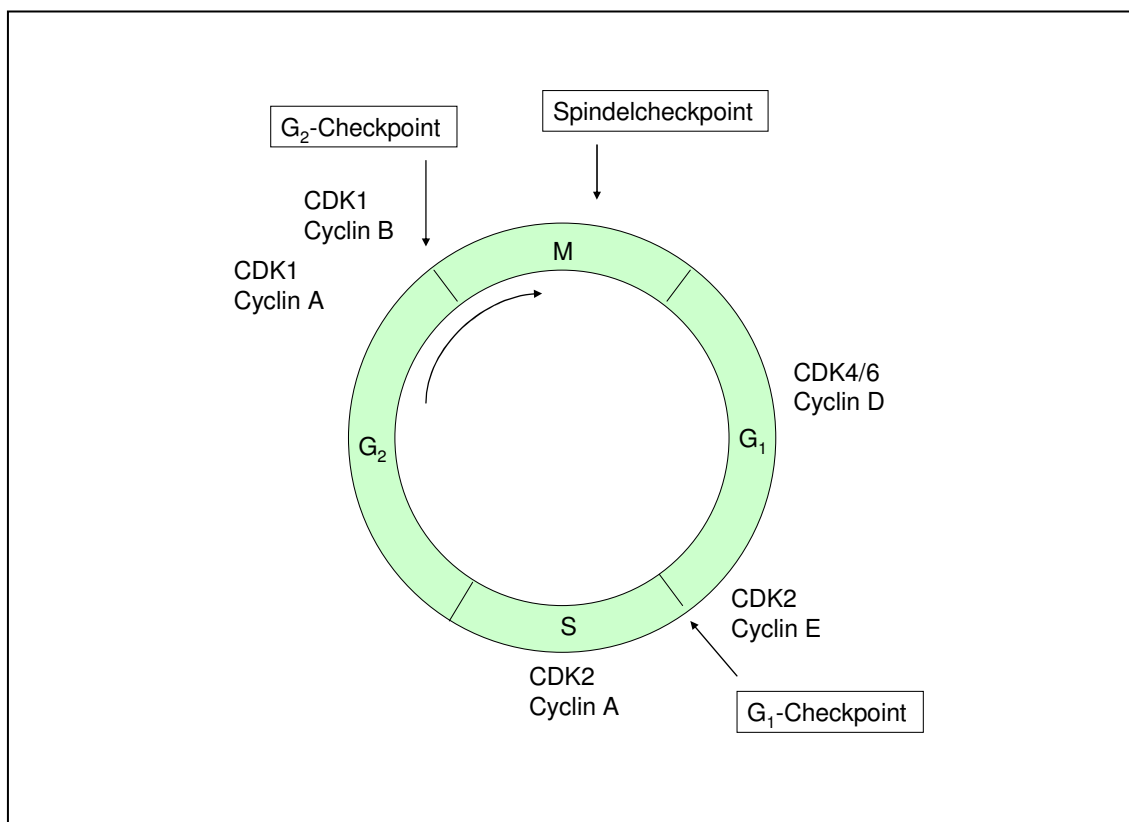


Abb.1: Zellzyklussteuerung durch cyclinabhängige Kinasen und Checkpoints

Der Zellzyklus besteht aus den vier Phasen M, S, G_1 und G_2 und wird gesteuert durch die cyclinabhängigen Kinasen und die dazugehörigen Cycline. Verschiedene Checkpoints kontrollieren das Voranschreiten des Zyklus.

Gesteuert wird der Zellzyklus durch die periodische Aktivität von speziellen Proteinkinasen. Diese Kinasen müssen einen Komplex mit einem Aktivatorprotein (Cyclin)

eingehen, um aktiv werden zu können, und werden daher als cyclinabhängige Kinasen (CDKs, Cyclin dependend kinases) bezeichnet (Doree und Hunt 2002). Zielproteine, die durch cyclinabhängige Kinasen phosphoryliert werden, leiten wesentliche Vorgänge des Zellzyklus ein. So ist beispielsweise eine verstärkte Aktivität von CDK1 im Komplex mit Cyclin B für eine Phosphorylierung von mitotischen Zielproteinen, die u.a. die Auflösung der Kernhülle einleiten, verantwortlich. Zusätzlich existieren Proteine, die das Aktivitätsniveau modulieren können. Die volle Aktivität entfaltet ein Cyclin-CDK-Komplex erst durch eine CDK-aktivierende-Kinase (CAK) (Kaldis 1999). Im Gegensatz dazu gibt es Proteine, die entweder durch Bindung oder durch Phosphorylierung inhibierend auf die cyclinabhängigen Kinasen einwirken (Sherr und Roberts 1999). Durch kontrollierte ubiquitinabhängige Proteolyse der Cycline werden bestimmte cyclinabhängigen Kinasen letztlich wieder inaktiviert (Peters 2006). Die Abb.1 zeigt die Phasen des Zellzyklus und die steuernden CDK-Cyclin-Komplexe.

Phasen der Mitose

Die Mitose selbst gliedert sich in verschiedene Phasen, dargestellt in Abb.2. In der Prophase löst sich die Kernmembran auf und die Chromosomen beginnen zu kondensieren. Während der Metaphase sind die Chromosomen maximal kondensiert und in der Äquatorialebene aufgereiht. Die Chromosomen sind über die Kinetochore mit den Mikrotubuli des Spindelapparats verbunden. Angeheftet werden die Mikrotubuli nach einem stochastischen Prinzip. Man spricht in diesem Kontext auch von einer dynamischen Instabilität der Mikrotubuli, denn die Mikrotubuli wachsen wiederholt aus und schrumpfen, falls kein Kontakt zu einem Kinetochor hergestellt werden konnte. Wenn die Mikrotubuli in die Äquatorialebene einwachsen und auf ein freies Kinetochor treffen, so wird diese Verbindung stabilisiert (Cassimeris 1993, Tanaka und Desai 2008).

Der Übergang von der Metaphase in die Anaphase ist in dieser Arbeit von zentraler Bedeutung. Wenn alle Chromosomen mit dem Spindelapparat vollständig verbunden sind, kommt es zur Trennung der Schwesterchromatiden. Dies ist die Einleitung der Anaphase. Die Trennung wird durch einen Kontrollmechanismus so lange hinausgezögert bis alle Chromosomen korrekt angeheftet sind. Dieser Kontrollmechanismus wird als Spindelcheckpoint bezeichnet (Meraldi *et al.* 2004, Musacchio und Salmon 2007).

Nach der Anaphase beginnen in der Telophase die Teilung des Zytoplasmas und der Aufbau der Kernmembran. An die Mitose schließt sich die Zytokinese an.

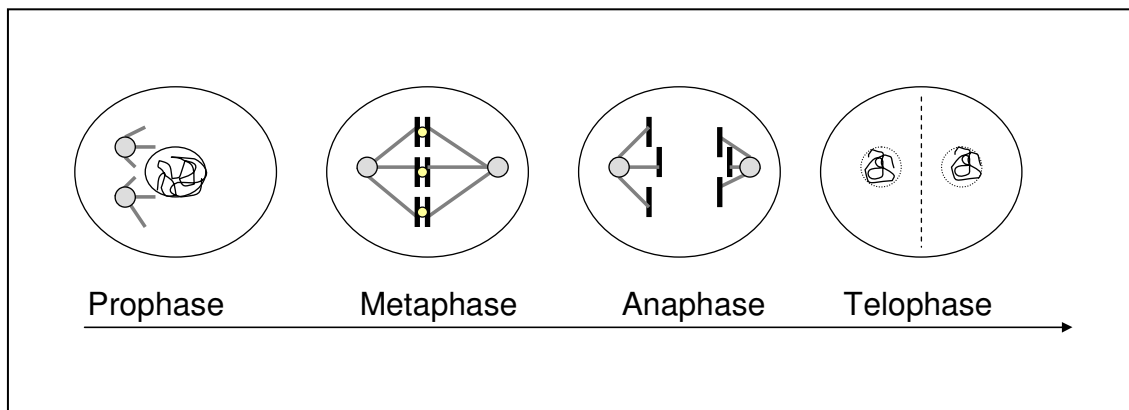


Abb.2: Phasen der Mitose

In der Prophase beginnen die Auflösung der Kernmembran und die Kondensation der Chromosomen. In der Metaphase sind die Chromosomen in der Äquatorialebene aufgereiht und mit dem Spindelapparat verbunden. Die Trennung der Schwester-Chromatiden findet in der Anaphase statt und in der Telophase beginnt die Teilung des Zytoplasmas sowie die Bildung der neuen Kernhüllen (Alberts *et al.* 2004).

2.3 Spindelcheckpoint

Allgemeine Definition von Checkpoints

Die Checkpoints des Zellzyklus sind Kontrollpunkte, an denen der Zellzyklus angehalten werden kann, falls die Vorgänge einer Phase noch nicht vollständig und fehlerfrei abgeschlossen sind (Hartwell 1992). Diese Checkpoints sichern die genetische Integrität einer Zelle. Der Eintritt in die Mitose wird zum Beispiel verhindert, wenn die Replikation der DNA noch nicht vollständig abgeschlossen ist. In den Phasen G_1 und G_2 existieren Kontrollmechanismen, die im Fall einer DNA-Schädigung dafür sorgen, dass mehr Zeit für die Reparatur zur Verfügung steht (Alberts *et al.* 2004) oder bei irreparablen Schäden die Apoptose eingeleitet wird. Ein Funktionsverlust eines Checkpoints führt dazu, dass ein genetischer Schaden nicht erkannt bzw. nicht behoben werden kann und schließlich an die Tochterzellen weitergegeben wird. Dies kann direkt zur Tumorgenese beitragen.

Definition des Spindelcheckpoints

In der Mitose wird der Übergang von der Metaphase in die Anaphase durch den Spindelcheckpoint kontrolliert (Sullivan und Morgan 2007). Dieser Checkpoint stellt die korrekte Aufteilung der Schwesterchromatiden auf die Tochterzellen sicher. Ist die Funktion des Spindelcheckpoints eingeschränkt, so kann es zum fortwährenden Verlust oder Zugewinn von Chromosomen über mehrere Generationen kommen. Diesen Prozess bezeichnet man als chromosomale Instabilität (CIN), ein charakteristisches Merkmal für Tumorzellen (Lengauer *et al.* 1998). Davon abzugrenzen ist der Begriff der Aneuploidie, der einen Zustand chromosomaler Fehlverteilung beschreibt. Man muss jedoch prinzipiell beachten, dass genetische Instabilität kein obligates Merkmal maligner Zellen darstellt. Chromosomale Instabilität ist assoziiert mit aggressivem Wachstumsverhalten und einer schlechten Prognose für den Patienten. Eine Meta-Analyse hat beispielsweise ergeben, dass colorektale Karzinome mit CIN eine schlechtere Prognose haben (Walther *et al.* 2008). Weiterhin bleibt das Ursachen-Wirkungsgefüge zu klären. Entarten chromosomal instabile Zellen zu Tumorzellen oder werden Tumorzellen chromosomal instabil?

Nach aktuellen Modellvorstellungen verhindert der aktive Spindelcheckpoint die Auftrennung der Schwesterchromatiden und somit den Beginn der Anaphase (Musacchio und Salmon 2007). Sobald alle Chromatiden über die Kinetochoren mit dem Spindelapparat verbunden sind, wird das inhibierende Signal aufgehoben und es erfolgt die Trennung der Schwesterchromatiden. Ein einziges Kinetochor, das nicht mit dem Spindelapparat verbunden ist, reicht aus, um den Beginn der Anaphase zu verzögern (Rieder *et al.* 1995). Aus molekularer Sicht handelt es sich um einen hochkomplexen Prozess, der bislang noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte.

Trennung der Schwesterchromatiden in der Mitose

Um den Wirkmechanismus des Spindelcheckpoints zu verstehen, muss der Mechanismus der Chromatidentrennung dargestellt werden (Abb.3). Im Zentrum steht der Enzymkomplex APC/C (Anaphase-Promoting-Complex/Cyclosom) mit der Funktion einer Ubiquitin-Ligase (Peters 2006). APC/C besteht aus mehreren Untereinheiten. Eine der Untereinheiten, Apc11, gehört zu der „RING-domain“-Proteinfamilie. Der Komplex bindet zwei Substrate: zum einen das Zielprotein, das ubiquitiniert werden soll und zum anderen ein E2-Enzym, das Ubiquitin-Reste auf eine Lysin-Seitenkette des Zielproteins überträgt. Das E2-Enzym, UbcH10, wird von der

Untereinheit Apc11 gebunden und ist für die mitotische APC/C vermittelte Proteolyse notwendig (Bastians *et al.* 1999). Für die Bindung des Zielproteins werden so genannte „aktivierende“ Untereinheiten bzw. Kofaktoren benötigt: Cdc20 oder Cdh1. Diese Kofaktoren interagieren mit den Untereinheiten im Kern des Enzymkomplexes APC/C. Das 26S Proteasom erkennt die Polyubiquitinketten und baut die Zielproteine schließlich ab (Peters 2006).

APC/C fördert den Abbau mitotischer Kontrollproteine. Schlüsselsubstrate von APC/C sind Securin und Cyclin B (Peters 2006). Securin bindet und inaktiviert eine Protease, die als Separase bezeichnet wird. Zur Aktivierung der Separase kommt es durch den

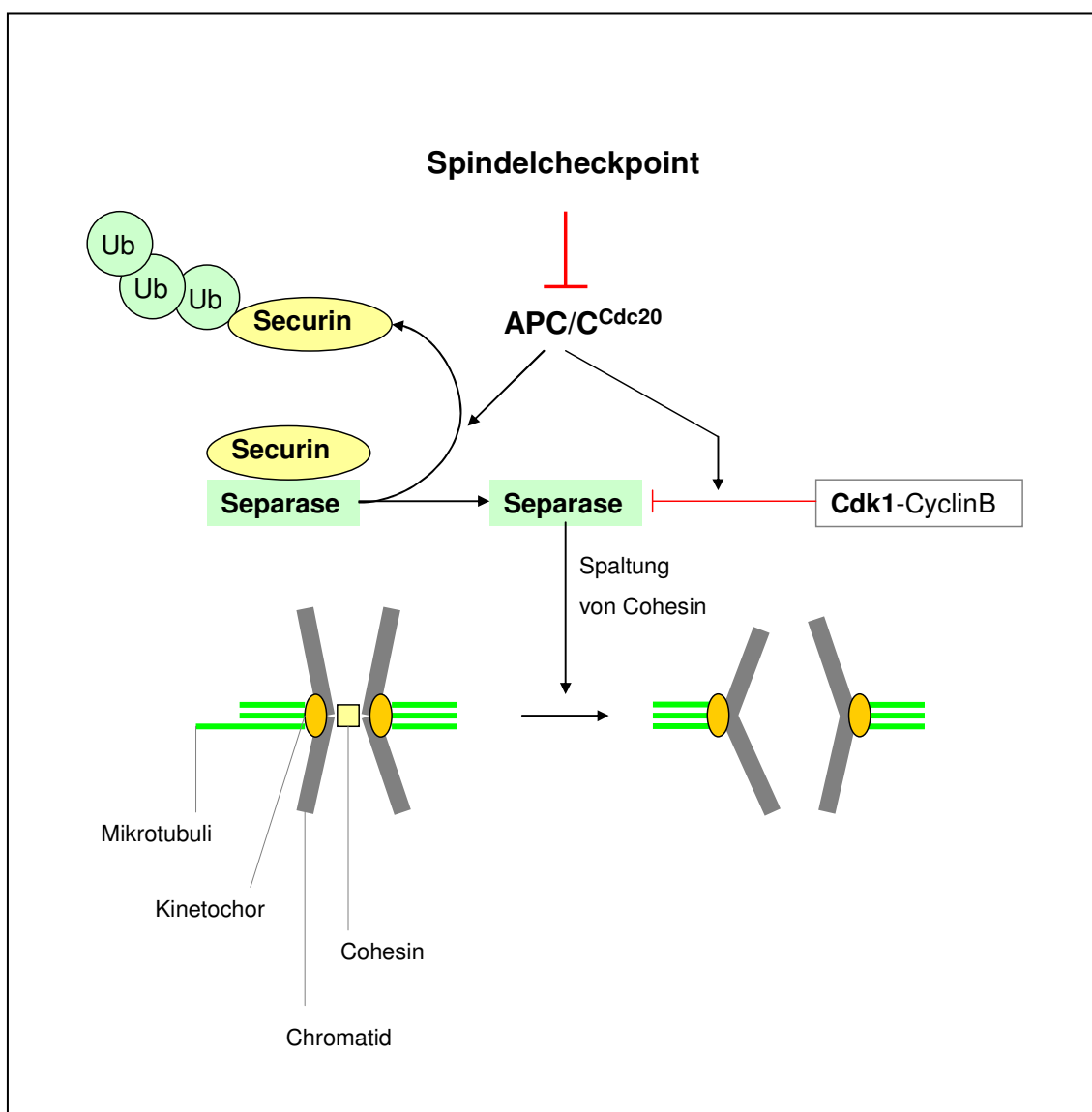


Abb.3: Trennung der Schwesterchromatiden

APC/C fördert den Abbau von Securin und Cyclin B. Infolge dessen kommt es zu einer Aktivierung der Separase, die eine enzymatische Spaltung der Cohesin-Komplexe einleitet und damit die Schwesterchromatiden voneinander trennt.

ubiquitinsteuerten Abbau von Securin. Die aktive Separase ist wiederum verantwortlich für die plötzliche Spaltung des Cohesinkomplexes, der die Schwesterchromatiden fest miteinander verbindet (Waizenegger *et al.* 2000). Zusätzlich vermutet man, dass die Separase dephosphoryliert werden muss, bevor die Zelle in die Anaphase eintreten kann. Es ist bekannt, dass CDK1-Cyclin B die Separase phosphoryliert und es wird ferner diskutiert, ob eine Dephosphorylierung am Ende der Anaphase stattfindet, zu dem Zeitpunkt des Cyclin B-Abbaus. Eine Phosphatase ist in diesem Zusammenhang bisher nicht bekannt (Sullivan und Morgan 2007).

Der Abbau von Cyclin B und somit die Inaktivierung von CDK1 ist essentiell für einen Austritt aus der Mitose (Alberts *et al.* 2004). Cdh1, der zweite Kofaktor von APC/C, wird durch Dephosphorylierung infolge der Inaktivierung der cyclinabhängigen Kinasen aktiviert. Cdh1 hat ein größeres Substratspektrum und führt auf diese Weise zum Abbau zusätzlicher Proteine in der späten Mitose, z.B. von Cdc20, Plk1 und den Aurora-Kinasen (Sullivan und Morgan 2007).

Mechanismus des Spindelcheckpoints

Der Spindelcheckpoint hemmt den Signalweg zur Trennung der Schwesterchromatiden und erzeugt so eine mitotische Verzögerung. Die Signalkaskade des Spindelcheckpoints soll nun mit Schwerpunkt auf den für diese Arbeit relevanten Aspekten erläutert werden (eine umfassende Zusammenfassung siehe Musacchio und Hardwick 2002; Taylor *et al.* 2004, Musacchio und Salmon 2007).

Im Zentrum des Spindelcheckpoints steht nach heutigen Erkenntnissen ein Proteinkomplex, der als „Mitotic Checkpoint Complex“ (MCC) bezeichnet wird. Dieser Komplex beinhaltet Cdc20, eine aktivierende Untereinheit von APC/C. Daneben gehören noch die Proteine Mad2, BubR1 und Bub3 zu dem Komplex. MCC bindet an APC/C und scheint so die Funktion der Ubiquitin-Ligase zu inhibieren (Sudakin *et al.* 2001). Der genaue Inhibitionsmechanismus ist bislang jedoch noch nicht aufgeklärt. Darüber hinaus werden die Proteine, die den Komplex regulieren und dessen Bildung stimulieren, zu den Spindelcheckpoint-Proteinen gezählt.

Ursprünglich wurden die Gene *MAD1*, *MAD2* und *MAD3* (mitotic-arrest deficient) sowie die Gene *BUB1* und *BUB3* (budding uninhibited by benzimidazole) in der Hefe *S.cerevisiae* identifiziert (Hoyt *et al.* 1991, Li und Murray 1991).

Die einzelnen Proteine des Spindelcheckpoints werden nun in Bezug auf ihre Lokalisation und Funktion vorgestellt. Mad2 ist Bestandteil des MCC und darüber

hinaus mit Mad1 im Komplex am Kinetochore lokalisiert (Musacchio und Salmon 2007). Mad1 rekrutiert Mad2 zum Kinetochor und aktiviert Mad2 durch eine induzierte Konformationsänderung.

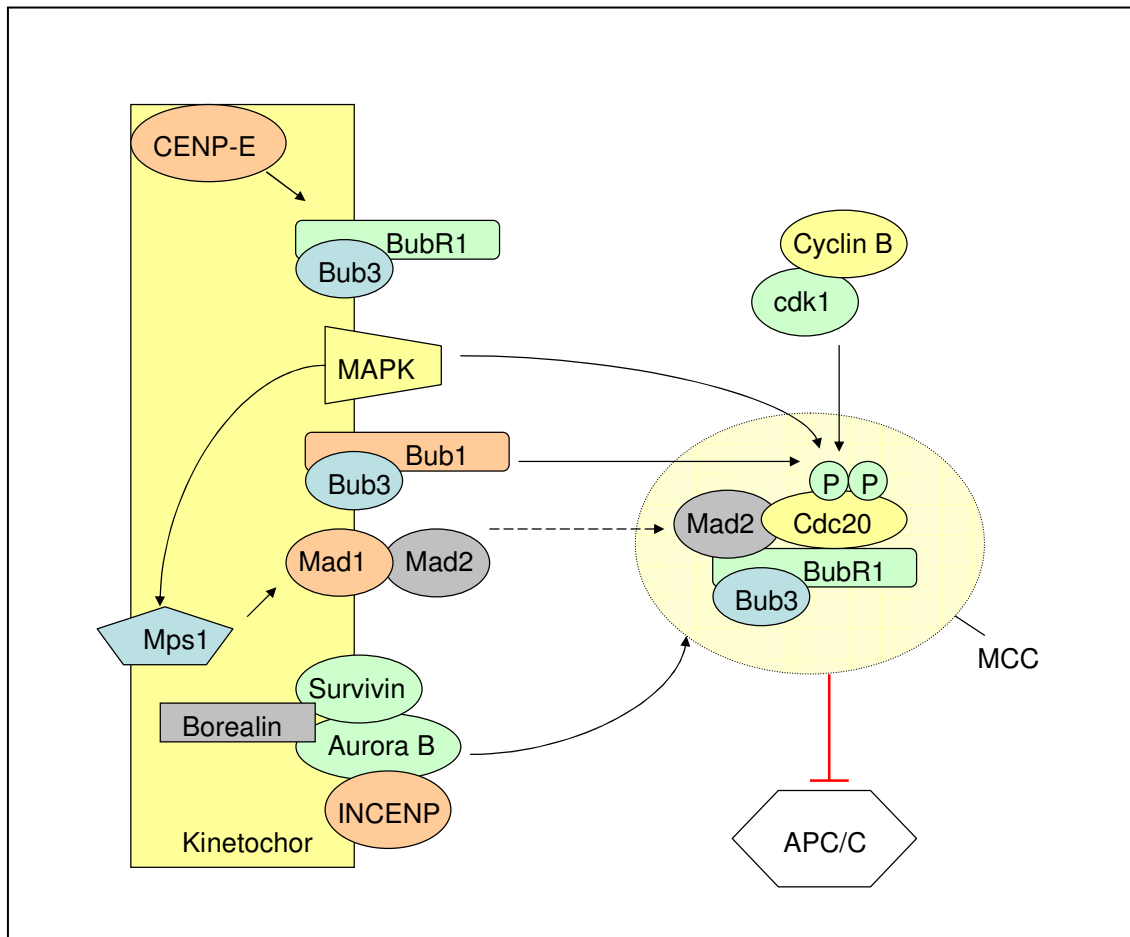


Abb.4: Modell des Spindelcheckpoints in Anlehnung an (Taylor *et al.* 2004 und Musacchio und Salmon 2007)

Im Zentrum des Spindelcheckpoints steht der Proteinkomplex MCC bestehend aus Cdc20, Mad2, BubR1 und Bub3. Die Bildung dieses Komplexes wird durch Komponenten des Spindelcheckpoints stimuliert, die am Kinetochor lokalisiert sind. Aurora B bildet einen Komplex mit Survivin, Borealin und INCENP. Mad1 im Komplex mit Mad2 fördert die Bindung von Mad2 an Cdc20. Bub1 phosphoryliert Cdc20.

Das Hefe-Protein Mad3 entspricht dem humanen BubR1 (Bub1-related protein). Im Gegensatz zu Mad3 besitzt hBubR1 Kinase-Aktivität und wird durch CENP-E aktiviert (Mao *et al.* 2003). Bub1 ist ebenfalls eine Checkpoint-Kinase, die bei aktiviertem Spindelcheckpoint mittels Bub3 am Kinetochor lokalisiert und für die Phosphorylierung von Cdc20 verantwortlich ist (Taylor *et al.* 1998). Die Kinase Mps1 (Monopolar spindle

1; Winey *et al.* 1991) ist beteiligt an der Lokalisation der Checkpoint-Proteine Mad1, Mad2, Plk1 und CENP-E am Kinetochor (Musacchio und Salmon 2007).

Wie agieren nun die Spindelcheckpoint-Proteine im Zusammenhang? Die Abb.4 bietet einen Überblick über den Zusammenhang der Spindelcheckpoint-Komponenten. Es ist nicht genau bekannt, wie und wo exakt der MCC gebildet wird. Wahrscheinlich dient das Kinetochor als katalytische Plattform, wie z.B. im „Mad2-Template-Model“ vorgeschlagen. Dieses Modell (De Antoni *et al.* 2005) besagt, dass es zwei unterschiedliche Konformationen von Mad2 gibt, nämlich eine „offene“ und eine „geschlossene“ Form. In der Bindung mit Mad1 liegt Mad2 als geschlossene Form vor und ist während der aktiven Phase des Spindelcheckpoints am Kinetochor lokalisiert. Der Mad1-Mad2-Komplex wird durch Mps1 zum Kinetochor rekrutiert und bildet „offenes“ Mad2. Mad1-Mad2 erleichtert die Bindung von Mad2 an Cdc20, den Kern des MCC. Cdc20 bindet „offenes“ Mad2 und wandelt es in die geschlossene Konformation um. Letztlich liegt Mad2 in der Bindung mit Cdc20 in derselben Form vor wie in der Bindung mit Mad1. Ein weiterer aktivierender Mechanismus des MCC ist die Phosphorylierung von Cdc20 durch Cdk1, Bub1 und eine MAPK (Chung und Chen 2003, Tang *et al.* 2004). Aurora B stimuliert die Bildung des MCC und bildet einen Komplex mit Survivin, Borealin und INCENP. Das Zielprotein der Kinase BubR1 ist bislang noch nicht bekannt, seine Kinase-Aktivität ist jedoch wichtig für die Spindelcheckpoint-Aktivität. BubR1 wird durch CENP-E gebunden und aktiviert (Mao *et al.* 2003).

Sensormechanismen des Spindelcheckpoints

Es gibt Hinweise darauf, dass der Spindelcheckpoint zwei negative Signale registriert. Zum einen wird die fehlende Anheftung von Chromosomen registriert und zum anderen reagiert der Spindelcheckpoint auf fehlende mechanische Spannung über den Schwester-Chromatiden. Die Differenzierung zwischen fehlendem Kontakt und fehlender Spannung ist zum Teil schwierig (Pinsky und Biggins 2005). Bei der Registrierung des „Keine-Spannung-Signals“ scheint Aurora B einen zentralen Platz einzunehmen. So konnte gezeigt werden, dass Ipl1/Aurora B in *S. cerevisiae* für einen mitotischen Arrest bei fehlender Spannung notwendig ist, jedoch nicht für einen Arrest bei fehlendem Kontakt benötigt wird (Biggins und Murray 2001). Aurora B kontrolliert möglicherweise die Interaktion zwischen Mikrotubuli und Kinetochoroberfläche (Vader *et al.* 2006) und induziert eine Auflösung der defekten Mikrotubulus-Kinetochor-Verbindungen (Pinsky *et al.* 2006). Dadurch entsteht wiederum ein Kinetochor ohne

Kontakt zum Spindelapparat und der Spindelcheckpoint bleibt aktiv. Zusätzlich deuten weitere Ergebnisse darauf hin, dass Bub1 in den Signalweg der Anheftung involviert ist (Morrow *et al.* 2005).

Timing-Funktion von Mad2 und BubR1

Möglicherweise erfüllen Mad2 und BubR1 zwei Funktionen während der Mitose (Meraldi *et al.* 2004). Die eine Funktion besteht darin, den mitotischen Arrest bei nicht angehefteten Chromosomen aufrecht zu erhalten, zum Beispiel, wenn die Mikrotubuli durch Nocodazol depolymerisiert sind. Diese Funktion ist möglicherweise kinetochorabhängig und alle Bub- und Mad-Proteine werden dafür benötigt. Die zweite Funktion von Mad2 und BubR1 besteht im „timing“ der normalen Mitose. Diese Funktion ist vom Kinetochor unabhängig. In der frühen Prometaphase beginnt die Anlagerung der Spindelcheckpoint-Komponenten an das Kinetochor. Während dieser Phasen wird der mitotische Arrest durch zytosolisches Mad2 und BubR1 aufrechterhalten. Durch siRNA-Experimente konnte gezeigt werden, dass nur die Depletion des Mad2 oder BubR1 zu einem beschleunigten Ablauf der Mitose führt (Meraldi *et al.* 2004). Bildlich gesprochen wird zu Beginn jeder Mitose die Uhr aufgezogen. Ist die entsprechende Zeit abgelaufen, tritt die Zelle in die Anaphase ein, es sei denn die Chromosomen sind nicht vollständig mit dem Spindelapparat verbunden. Dann bleibt der Spindelcheckpoint kinetochorabhängig aktiv. Eine Senkung der BubR1- oder der Mad2-Menge hat zur Folge, dass die Uhr defekt ist und kürzer aufgezogen wird. Dann läuft die Mitose verkürzt ab. Generell bedeutet das, dass die Phase der Mitose individuell verlängert werden kann, abhängig davon ob noch freie Chromosomen existieren.

Spindelcheckpoint-Komponenten im Mausmodell

Eine vollständige Hemmung des Spindelcheckpoints führt in höheren Eukaryoten zur Letalität. Es ist bekannt, dass eine vollständige Deletion von *MAD2* bei Mäusen in der frühen Embryonalphase zum Tod führt (Dobles *et al.* 2000). Es kommt zu einer massiven Fehlverteilung (Aneuploidie) von Chromosomen, die zur Apoptose führt. Auch für die Spindelcheckpoint-Gene *BUB3*, *MAD1* und *BUBR1* konnte im Mausmodell embryonale Letalität nachgewiesen werden (Kalitsis *et al.* 2000, Iwanaga *et al.* 2007).

Weiterhin ist bekannt, dass eine heterozygote Deletion von Spindelcheckpoint-Genen zu einer erhöhten Tumor-Inzidenz in Mäusen führt. Dies ist nachgewiesen für *MAD1* (Iwanaga *et al.* 2007). Die heterozygoten Mäuse wiesen ein zweifach erhöhtes Risiko auf. Unter Behandlung mit Vincristin, einem *Vinca*-Alkaloid, entwickelten die heterozygoten Tiere sehr häufig Neoplasien im Gegensatz zum Wildtyp.

2.4 Krebstherapie – Gegenstand der Forschung

Konzept der Krebstherapie

Die Therapie maligner Erkrankungen ist komplex, langwierig und oft mit beträchtlichen Nebenwirkungen verbunden. Wenn man einen Patienten chemotherapeutisch oder strahlentherapeutisch behandelt, so schädigt man ebenfalls das umgebende gesunde Gewebe.

Einleitend soll ein kurzer Überblick über die drei klassischen Möglichkeiten der Krebstherapie gegeben werden. Die klassische Krebstherapie basiert auf Chirurgie, Strahlentherapie und Chemotherapie. Natürlich kann die heutige Krebstherapie an dieser Stelle nicht ausführlich und erschöpfend behandelt werden.

Grundsätzliche Therapieentscheidungen, z.B. welche Therapieform zum Einsatz kommt, werden möglichst basierend auf der histologischen Diagnose und entsprechend der Tumorausbreitung gefällt (Kauffmann *et al.* 2006). Die Tumorausbreitung wird durch die TNM-Klassifikation bestimmt, welche die Tumorgroße, den Lymphknotenbefall, sowie die Metastasierung berücksichtigt (T = Tumor, N = Nodes, M = Metastasis).

Wirkmechanismen klassischer Chemotherapeutika

Ziel der Chemotherapie ist es, Krebszellen zu eliminieren. Die Chemotherapie kommt vor allem bei disseminierten Tumoren sowie Metastasen und ausgedehnten Befunden zum Einsatz. Die Substanzen, die dazu verabreicht werden, bezeichnet man als antineoplastisch. Besonders sensitiv gegenüber der Chemotherapie erweisen sich schnell proliferierende Tumore (Aktories *et al.* 2006).

Angriffspunkt vieler dieser Substanzen ist die DNA, die als Informationsspeicher für die Funktion der Zelle von zentraler Bedeutung ist. Registriert die Zelle einen massiven DNA-Schaden, der nicht mehr reparabel ist, dann startet die Zelle ein Selbstmordprogramm, die Apoptose. Die Struktur der DNA kann beispielsweise durch Alkylierung

geschädigt werden. Dies hat eine Vernetzung zwischen den DNA-Strängen zur Konsequenz. Ein Beispiel für diese Substanzgruppe alkylierender Agenzien ist Cyclophosphamid.

Die Wirksamkeit von platinhaltigen Verbindungen gegen Tumore ist schon seit 1965 bekannt (Aktories *et al.* 2006). Der Wirkmechanismus z.B. von Cisplatin beruht auf einer Induktion von Quervernetzungen innerhalb eines DNA-Strangs. Dies führt letztlich zur Einleitung der Apoptose.

Ein anderer Ansatzpunkt ist die Blockade der DNA-Synthese. Die Verdopplung der DNA ist eine Voraussetzung für die Zellteilung. Durch Antimetabolite kann die Synthese von DNA gestört werden. Zu dieser Substanzgruppe zählen zum einen Folsäureantagonisten, wie z.B. Methotrexat und zum anderen Basenanaloga wie beispielsweise 5-Fluoruracil. Auch Hydroxyharnstoff erzeugt durch die Hemmung der Ribonucleotid-Reduktase eine Blockade der DNA-Synthese.

Topoisomerase-Inhibitoren greifen ebenfalls in die Replikation der DNA ein. Durch Inhibitoren, wie z.B. Etoposid, wird die Topoisomerase II gebunden und im „cleavable complex“, der für die Replikation benötigt wird, überstabilisiert. Es kommt zu einer Persistenz der Doppelstrangbrüche, die vorübergehend für die Replikation notwendig sind. Bei Hemmung der Topoisomerase I durch Camptothecin wird die Spaltung und darauf folgende Verknüpfung der DNA-Stränge gestört.

Andere Substanzen wirken nicht direkt auf die DNA oder ihren Stoffwechsel ein. *Vinca*-Alkaloide (aus *Vinca rosea*) und Taxane (isoliert aus der pazifischen Eibe *Taxus brevifolia*) greifen zum Beispiel in die Mechanik der Zellteilung ein. Durch diese Substanzen wird die Dynamik der Mikrotubuli, die in der Mitose die Spindel bilden, empfindlich gestört. Der ordnungsgemäße Auf- und Abbau und die Funktionalität des Spindelapparats sind jedoch essentiell für die Zellteilung. Es ist wichtig, die molekularen Wirkmechanismen dieser beiden Gruppen von Mitosehemmstoffen zu unterscheiden. *Vinca*-Alkaloide, wie zum Beispiel Vincristin, oder Nocodazol unterbinden die Polymerisation von Tubulin-Untereinheiten zu Mikrotubuli. Das bedeutet, dass keine Spindelfasern ausgebildet werden können. Taxane dagegen überstabilisieren die Spindelfasern, indem eine Depolymerisation der Mikrotubuli verhindert wird. Im Unterschied zu den *Vinca*-Alkaloiden sind hier Spindelfasern ausgebildet, die keine Dynamik zeigen. Letztlich bedeutet dies für die mitotische Zelle, dass die Chromosomen nicht zu den Spindelpolen gezogen werden können (Schmidt und Bastians 2007).

Nebenwirkungen der Chemotherapie

Chemotherapeutika weisen insgesamt eine sehr hohe Zytotoxizität auf. Beispielsweise ist Cyclophosphamid eine Weiterentwicklung eines Giftgases, das als Senfgas bezeichnet wird und zu den Gelbkreuzgiften zählt (Diefenbach 2003). Es handelt sich ursprünglich um einen Hautkampfstoff, der unter anderem im ersten Weltkrieg eingesetzt worden ist (Aktories *et al.* 2006). Cyclophosphamid ist ein „Prodrug“ und wird z. B. in der Behandlung von Non-Hodgkin-Lymphomen verwendet. Es kann seine therapeutische Wirkung erst nach Aktivierung durch Cytochrom-P-450-abhängige Monooxygenasen entfalten. Es ist jedoch offensichtlich, dass durch die Weiterentwicklung zum Prodrug lediglich die Nebenwirkungen reduziert und die Anwendbarkeit der Substanz optimiert wurden. Es konnte aber keine verbesserte selektive Wirkung bezüglich maligner Zellen erzielt werden. Insgesamt gibt es sehr viele unterschiedliche Medikamente zur Chemotherapie, die alle auf schnell proliferierendes Gewebe wirken sowohl auf Tumorgewebe als auch auf normales Gewebe. Die Patienten leiden oft schwer unter den erheblichen Nebenwirkungen einer Chemotherapie. Sehr häufig sind Übelkeit, Erbrechen, Durchfälle, schwere Erosionen der intestinalen Schleimhäute und Haarausfall. Auch das Knochenmark wird häufig in Mitleidenschaft gezogen und es kommt zur Knochenmarksdepression. Daraus folgt Immunsuppression und unter Umständen eine transfusionspflichtige Anämie. Die Schädigung des Immunsystems führt zu einer erhöhten Infektanfälligkeit der Patienten. Auf lange Sicht können Leber- und Nierenschäden sowie neurotoxische Schäden verbunden mit Lähmungen oder Sensibilitätsverlusten auftreten (Aktories *et al.* 2006).

Strahlentherapie verursacht DNA-Schäden

Die Strahlentherapie kann als alleinige Therapieform eingesetzt werden, sie ist aber auch prä- oder postoperativ sowie in Kombination mit einer Chemotherapie einsetzbar. Durch ionisierende Strahlen werden DNA-Schäden verursacht, die letztlich zur Aktivierung des Apoptose-Programms führen. Doch auch die Strahlentherapie muss kritisch unter dem Aspekt der Selektivität betrachtet werden. Ionisierende Strahlen schädigen Krebszellen, sie schädigen aber ebenso gesunde Zellen. Durch eine bestimmte Technik kann eine selektivere Schädigung von Tumorzellen erreicht werden, nämlich das Konzept der Fraktionierung, welches auf der Annahme beruht, dass Tumorzellen in ihren DNA-Reparaturmechanismen eingeschränkter sind als normale Zellen (Kauffmann *et al.* 2006). Die zu applizierende Dosis wird also auf mehrere

Fraktionen aufgeteilt. In der Zeit zwischen zwei Bestrahlungen wird im normalen Gewebe der Schaden behoben und im Tumorgewebe läuft der Prozess der Reparatur entsprechend unzureichender ab. So akkumulieren DNA-Schäden in der Tumorzelle.

Selektivität der Chirurgie

Die dritte Säule der klassischen Krebstherapie, neben Strahlentherapie und Chemotherapie, stellt die Chirurgie dar. Tumorgewebe kann mit einem definierten Sicherheitssaum chirurgisch selektiv entfernt werden. Während der Operation werden histologische Schnellschnitte des Resektats vom Pathologen hinsichtlich der Frage untersucht, ob der Rand des Resektats von Tumorzellen infiltriert ist, um ggf. weiteres Gewebe zu entfernen. Trotz intraoperativem Schnellschnitt kann man sich jedoch nicht sicher sein, dass sämtliches Tumorgewebe entfernt werden konnte. In vielen Fällen bleibt die Absiedlung von Mikrometastasen unentdeckt und es kommt nach einigen Monaten oder Jahren zum Rezidiv. Zudem ist zu bedenken, dass manche Patienten an einem inoperablen Tumor leiden. Einerseits gibt es hämatoonkologische Erkrankungen, wie zum Beispiel die akute myeloische Leukämie, die aus Prinzip nicht operabel ist. Andererseits gibt es Tumore, die zwar im Allgemeinen operabel sind, jedoch durch lokale Infiltrationen eine Operation unmöglich machen. Dies gilt beispielsweise für einen Tumor, der die Aorta bereits infiltriert hat.

Prinzipiell ist zu bedenken, dass Krebs eine Erkrankung ist, die zumeist im höheren Lebensalter auftritt. Daher muss die Frage berücksichtigt werden, ob der Patient angesichts seines Alters überhaupt narkosetfähig und operabel ist. Zudem ist mit einer Zunahme der Inzidenz von Krebserkrankungen zu rechnen, da das demographische Alter der Bevölkerung in den Industrienationen weiter steigt.

2.5 Zielgerichtete molekulare Krebstherapie

Klassische Krebstherapie im Vergleich zur „targeted therapy“

Neben den drei klassischen Säulen der Krebstherapie ist eine weitere Therapieform entstanden, die gezielt molekulare Mechanismen in Tumorzellen ausnutzt. Die neue Form der Therapie wird als „spezifische molekulare Therapie“ bzw. „targeted therapy“ bezeichnet.

Das Prinzip besteht in der spezifischen Aktivierung oder Inaktivierung von Zielmolekülen in malignen Zellen. Das wohl bekannteste Beispiel und einer der ersten

Therapieansätze auf dem Gebiet der „targeted therapy“ ist Tamoxifen. Dieser selektive Östrogenrezeptormodulator wird in der Therapie von Mammakarzinomen eingesetzt (Jordan 2003).

„Small molecule inhibitors“ bieten Möglichkeit zur Inhibierung

Wie der Name schon sagt, handelt es sich dabei um kleine Moleküle, die die Interaktion von Proteinen modulieren. Um ein Protein in seiner Funktion zu inhibieren, muss der „small molecule inhibitor“ am „hot spot“ eines Proteins binden. „Small molecule inhibitors“ können leicht an Proteine anbinden, wenn von Natur aus Bindestellen für kleine Peptide vorhanden sind und wenn ein Protein Bindetaschen besitzt, in die sich der Inhibitor dann einlagern kann (Arkin und Wells 2004). Einige Inhibitoren der cyclinabhängigen Kinasen interagieren zum Beispiel direkt mit der ATP-Bindedomäne und inhibieren somit die Kinase-Aktivität (Senderowicz 2003). Dazu gehören Roscovitin und Flavopiridol. Viele Substanzen aus dem Bereich der „small molecule inhibitors“ sind in klinischen Studien oder bereits zur Therapie zugelassen. Für die Behandlung des multiplen Myeloms ist beispielsweise der „small molecule inhibitor“ Bortezomib, ein Proteasom-Inhibitor zugelassen. Durch die Blockade des Proteasoms wird der Abbau von Proteinen, die den Zellzyklus und das Zellwachstum regulieren, unterdrückt. Dies führt letztlich zur Hemmung der Zellteilung und zur Einleitung der Apoptose.

siRNA senkt die Expression der Proteinmenge

Die Inaktivierung eines Proteins kann auch durch das Absenken der Proteinmenge erreicht werden. Als Methode kommt hier die Verwendung von siRNA (small interfering RNA) zum Einsatz. Durch diese Methode wird die Neusynthese des spezifischen Proteins auf RNA-Ebene gestoppt. Dazu werden kurze RNA-Doppelstrang-Sequenzen in die Zelle eingebracht, die von der Zelle als fremd erkannt werden. Es bildet sich ein so genannter „RNA-induced silencing complex“ (RISC) mit der Doppelstrang-RNA im Zentrum. Der Komplex enthält viele verschiedene Proteine, unter anderem „Dicer“-Enzyme, die in der Lage sind RNA zu spalten. Die siRNA wird in dem RISC-Komplex entwunden und beide Stränge werden voneinander getrennt. Der Antisense-RNA-Strang der siRNA verbleibt in dem Komplex und dient als Vorlage zur Erkennung weiterer mRNA mit komplementärer Sequenz, die dann gespalten wird

(Abb.5). Auf diese Weise wird die mRNA erkannt, systematisch gespalten und damit für die Proteinsynthese unbrauchbar gemacht (Rana 2007).

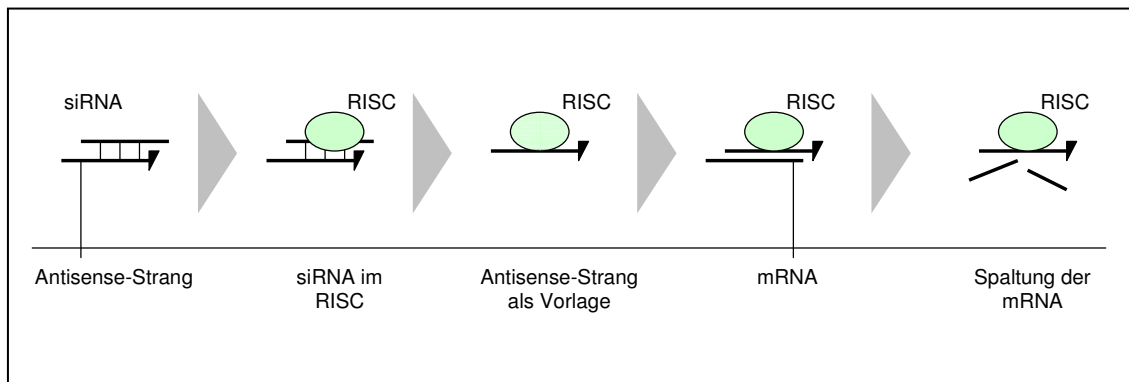


Abb.5: RNA-Interferenz in Anlehnung an Rana (Rana 2007)

Doppelsträngige RNA wird in die Zelle eingebracht und es bildet sich ein RISC-Komplex. Der Antisense-Strang verbleibt im RISC zur Erkennung von mRNA mit komplementärer Sequenz. Die erkannte RNA wird schließlich durch DICER gespalten.

Therapeutische Ansätze mittels siRNA sind bereits in klinischen Studien getestet worden. In einer Phase-II-Studie sind Patienten mit einer altersbedingten Makuladegeneration (AMD) mit siRNA behandelt worden (Bumcrot *et al.* 2006). Bei der AMD handelt es sich um eine Erkrankung der Netzhaut, bei der es im Alter zur Einwachsung neuer Gefäße in den Fleck des schärfsten Sehens kommt. Dadurch erleiden die Patienten einen erheblichen Verlust der Sehschärfe (Grehn 2006). Die siRNA richtet sich gegen VEGF, einen Gefäßwachstumsfaktor, der in der Signalkaskade der Neovaskularisation eine wichtige Rolle spielt. Des Weiteren werden siRNAs in einigen Tiermodellen bezüglich humaner Erkrankungen getestet. In der Literatur werden viele mögliche Zielproteine hinsichtlich der Krebstherapie durch siRNA diskutiert (Mocellin *et al.* 2006, Bumcrot *et al.* 2006, Grimm und Kay 2007).

Einsatz von spezifischen Antikörpern zur Inhibierung von Zielmolekülen

Die Therapie mit spezifischen Antikörpern zählt auch zur „targeted therapy“. Ein wichtiges Beispiel hierfür ist Rituximab, ein monoklonaler chimärer Antikörper mit humanen und murinen Strukturanteilen. Rituximab wird bei Non-Hodgkin-Lymphomen (NHL) in Kombination mit anderen Chemotherapeutika eingesetzt (Marcus und Hagenbeek 2007). Der Antikörper richtet sich gegen CD20, ein Oberflächenprotein der B-Lymphozyten und leitet dann eine Immunantwort gegen den B-Lymphozyt ein, die in der Zelllyse mündet. Antikörper eignen sich zur spezifischen Erkennung von Strukturen

auf der Zelloberfläche, beispielsweise von Rezeptorproteinen. Trastuzumab ist ein Antikörper, der zur Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt wird und sich gegen den Rezeptor HER2 richtet.

2.6 Mitose als therapeutische Zielstruktur

Klassische Chemotherapeutika mit Wirkung auf die Mitose

Ziel der Chemotherapie ist es, die Mechanismen zur Aufrechterhaltung der chromosomalen Unversehrtheit in Krebszellen zu stören und als Folge die Apoptose zu induzieren. Zum einen kann dies durch DNA-Schädigung erreicht werden, zum anderen aber können chromosomale Störungen erzeugt werden, indem man in den Prozess der Chromosomenaufteilung während der Mitose eingreift. Zu den klassischen Chemotherapeutika, die auf die Mitose wirken, zählen die Taxane und die *Vinca*-Alkaloide. Diese Chemotherapeutika werden in der Klinik häufig und erfolgreich eingesetzt. Beispielsweise wird Taxol zur Behandlung des Mammakarzinoms eingesetzt. Taxane stabilisieren die Mikrotubuli durch Bindung an die luminal Seite von β -Tubulin. *Vinca*-Alkaloide führen in höheren Konzentrationen zu einer Depolymerisation der Mikrotubuli. In therapeutischen Dosen wird wahrscheinlich nur die Dynamik der Mikrotubuli eingeschränkt. *Vinca*-Alkaloide binden am β -Tubulin nahe der GTP-Bindedomäne. Als Nebenwirkung kann Polyneuropathie auftreten. Unter Therapie mit Vincristin beispielsweise kann es zu Sensibilitätsstörungen und motorischen Ausfällen kommen. Auch das autonome Nervensystem kann davon betroffen sein. Es können Obstipation, Darmkrämpfe und eine Ileussyndromatik auftreten. Diese Nebenwirkungen beruhen auf einer Interferenz mit den Mikrotubuli der Neuronen. Es kommt zu einer Störung des axonalen Transports in den Nervenzellen. Weiterhin tritt häufig eine Alopezie auf.

Mechanismen der Apoptose

Unter dem Begriff „Apoptose“ versteht man einen programmierten Zelltod. Eine apoptotische Zelle schrumpft und verdichtet sich. Es kommt zur Abschnürung von Membrananteilen und zu einem Zerfall des Zellkerns. Darüber hinaus wird die DNA in Stücke zerteilt. Final wird die apoptotische Zelle phagozytiert (Alberts *et al.* 2004). Typischerweise fehlt bei der Apoptose eine Entzündungsreaktion. Im Zentrum der Signalübermittlung stehen spezielle Proteasen, die als Caspasen bezeichnet werden. Die

Caspasen werden als Proenzyme synthetisiert und dann durch Proteolyse aktiviert. Einmal in Gang gesetzt, ist die Signalwirkung selbstverstärkend und unumkehrbar. Durch die Caspasen werden Schlüsselproteine im Zytoplasma und im Zellkern gespalten.

Die Signalkaskade kann durch intrinsische oder extrinsische Signale eingeleitet werden. Eine extrinsische Aktivierung erfolgt über die Stimulation von Fas-Proteinen, den sogenannten „Todesrezeptoren“ auf der Zelloberfläche, z.B. durch T-Lymphozyten. Bei intrinsischer Signalwirkung wird Cytochrom c aus den Mitochondrien freigesetzt, welches an das zytosolische Adapterprotein Apaf1 bindet und im Komplex zu einer Aktivierung der Procaspasen führt.

Die Apoptose kann aus unterschiedlichen Gründen eingeleitet werden. Zum einen wird in Zellen mit geschädigter DNA Apoptose induziert, zum anderen werden über diesen Prozess viral infizierte Zellen eliminiert. (Alberts *et al.* 2004). Darüber hinaus spielt die Apoptose in der embryonalen Entwicklung eine große Rolle.

Funktion des Spindelcheckpoints ist essentiell für die Wirkung von Taxol

Für die Wirkung von Spindel schädigenden Chemotherapeutika ist die Funktion des Spindelcheckpoints von essentieller Bedeutung. Taxane, wie auch *Vinca*-Alkaloide, führen unter klinisch eingesetzten Konzentrationen zu einer Einschränkung der Mikrotubuli-Dynamik. Es kommt zu einer Akkumulation der Zelle in der Mitose (Jordan *et al.* 1996). Es konnte gezeigt werden, dass ein verlängerter mitotischer Arrest und ein nachfolgendes Austreten aus diesem Arrest für die Einleitung der Apoptose durch Spindel schädigende Agenzien Voraussetzung ist (Sudo *et al.* 2004, Vogel *et al.* 2007). Der Austritt aus der Mitose geschieht vermutlich ausgelöst durch einen langsamen Abbau von Cyclin B (Brito und Rieder 2006). Die Zellen treten mit einem aberrantem Chromosomensatz in die G₁-Phase ein. In der G₁-Phase wird nun ein p53-abhängiger Checkpoint aktiviert und damit die Apoptose eingeleitet (Minn *et al.* 1996, Vogel *et al.* 2004).

Chemotherapieresistenz

Viele unterschiedliche Mechanismen können zu einer Therapieresistenz von Krebszellen gegenüber Chemotherapeutika führen. Durch genetische Instabilität, durch die sich Krebszellen häufig auszeichnen, können Mutationen in der Krebszelle akkumulieren. So können sich Defekte im Apoptose-Signalweg anhäufen und die

Krebszelle ist nicht mehr in der Lage Apoptose zu induzieren. Dieser Mechanismus gilt allgemein sowohl für Therapieansätze, die einen DNA-Schaden induzieren, aber auch für Chemotherapeutika, die mit den Mikrotubuli interferieren (Alberts *et al.* 2004).

Bezüglich der Resistenzentwicklung gegenüber Mikrotubuli-inhibierender Chemotherapeutika konnten bisher folgende Mechanismen aufgezeigt werden. Eine Resistenz gegenüber Taxol tritt bei der Überexpression von p-Glykoprotein (MDR1) auf (Huhn 2001). Es handelt sich dabei um eine plasmamembrangebundene Transport-ATPase, die lipophile Arzneistoffe aus der Zelle pumpt. Folglich sinkt die intrazelluläre Konzentration des Chemotherapeutikums (Alberts *et al.* 2004). Weiterhin ist gezeigt, dass veränderte Tubulin-Strukturen zu einer Resistenz gegenüber Taxol führen (Huhn 2001). Darüber hinaus ist die Funktionalität des Spindelcheckpoints für die Wirksamkeit von Taxol wichtig (Vogel *et al.* 2007). Eine normale Checkpointfunktion erfordert normale Proteinmengen der Checkpoint-Proteine BubR1, Bub1, Mad1, Mad2 und anderer Proteine. Ist die Funktion des Spindelcheckpoints eingeschränkt, spricht der Tumor nicht oder nur gering auf eine Therapie mit Taxol an.

„Small molecules“ mit Wirkung auf die Mitose

Die Mitose ist eine wichtige Zielstruktur in der Krebstherapie. Es ist daher von großer Bedeutung Medikamente zu entwickeln, die auf die Mitose einwirken, ohne jedoch die Funktion des Spindelapparates erheblich zu stören. Das Ziel dieser Entwicklungen ist eine Reduktion der Nebenwirkungen, die durch die Interferenz mit den Mikrotubuli entstehen.

Ein erfolgversprechender Ansatz ist zum Beispiel die Inhibition von Motorproteinen, die sich entlang der Mikrotubuli bewegen. Kinesin ist ein Motorprotein, das sich zum Plus-Ende des Mikrotubulus bewegt (Alberts *et al.* 2004). Unter den Kinesinen gibt es Proteine, die spezifisch in der Mitose Funktionen erfüllen, zum Beispiel KSP/Eg5 (kinesin spindle protein). Eg5 ist beteiligt an der Bildung einer bipolaren Spindel (Schmidt und Bastians 2007). Mehrere Eg5-Inhibitoren werden bereits in klinischen Studien getestet, z.B. Ispinesib (www.Cytokinetics.com). Darüber hinaus könnte Plk1 eine Zielstruktur für inhibitorische „small molecules“ darstellen. Plk1 ist in verschiedenen Tumoren überexprimiert und eine Funktionseinschränkung von Plk1 führt zu einem mitotischen Arrest und letztlich zum Zelltod (Schmidt und Bastians 2007). Der Plk1-Inhibitor BI2536 (Boehringer Ingelheim) beispielsweise hat die Phase II der klinischen Überprüfung erreicht (Steege 2007). Auch Aurora-Kinasen sind

häufig in Tumoren überexprimiert. Die Inhibition dieser Kinasen könnte in therapeutischem Sinne genutzt werden (Schmidt und Bastians 2007). VX-680 ist ein Aurora-Inhibitor, dessen Wirkung auf fortgeschrittene kolorektale Karzinome und nicht-kleinzellige Lungenkarzinome in Phase-II-Studien überprüft wird (Harrington 2004). Als weitere Therapieoption bietet sich die Inhibition von CDKs an. Flavopiridol ist eine der ersten Substanzen, die in diesem Zusammenhang in klinischen Studien an Patienten mit CLL getestet wurden (Senderowicz 2001).

3 Zielsetzung der Arbeit

Der Spindelcheckpoint ist ein wichtiger Kontrollmechanismus der Mitose, der die Euploidie sichert. Bei partiell inaktiviertem Spindelcheckpoint sind die Zellen zwar lebensfähig, weisen aber Aneuploidie auf. Ein nicht funktionsfähiger Spindelcheckpoint ist nicht mit dem Überleben der Zelle vereinbar. Die Zellen ohne Spindelcheckpoint weisen eine massive Chromosomen-Fehlverteilung auf und sterben (Kops *et al.* 2004). Der Spindelcheckpoint ist somit essentiell. Im Gegensatz dazu führt zum Beispiel der Verlust von p53 zu einem Ausfall des G₁-Checkpoints ohne die Lebensfähigkeit einzuschränken.

Die Inaktivierung des Spindelcheckpoints könnte eine neue Strategie zur Therapie gegen Krebs darstellen. Der Spindelcheckpoint ist für die Wirksamkeit von Taxol von großer Bedeutung. Ein gestörter Spindelcheckpoint führt zur Resistenz der Tumorzellen gegenüber Taxol. Eine neue Strategie diesen resistenten Tumorzellen zu begegnen, besteht in einer vollständigen Inaktivierung des Spindelcheckpoints. Daher soll nun ein Weg gefunden werden, die Signalkaskade des Spindelcheckpoints spezifisch zu modulieren. Doch nicht nur im Hinblick auf neue therapeutische Möglichkeiten ist eine Modulation des Spindelcheckpoint interessant. Es liegt auch im Interesse der Grundlagenforschung ein spezifisches Instrument zu erlangen, um den Signalweg des Spindelcheckpoints eingehend zu erforschen. Ein spezifischer Inhibitor wäre hierfür von großem Nutzen.

Im Zentrum dieser Arbeit steht daher ein pharmakologischer Inhibitor des Spindelcheckpoints, Gö6976, der hinsichtlich mehrerer Aspekte charakterisiert wurde. Es wurde untersucht, wie dieser Inhibitor auf den Checkpoint wirkt und welche Konsequenzen auf zellulärer Ebene zu beobachten sind. Daran anschließend soll diskutiert werden, ob dieser Wirkmechanismus für die Entwicklung eines neuen Chemotherapeutikums geeignet ist und ob der Inhibitor als spezifisches Instrument zur Untersuchung des Checkpoints eingesetzt werden kann.

4 Ergebnisse

4.1 Inaktivierung des Spindelcheckpoints

In einem Zell-basierenden Screen wurde die Indolocarbazol-Substanz Gö6976 als potenter Inhibitor des Spindelcheckpoints identifiziert (Stolz *et al.* 2009). Die Inaktivierung des Spindelcheckpoints ist in diesem Kontext definiert als Austritt aus einem mitotischen Arrest induziert durch Spindelbeschädigung. Erstens konnte durch FACS-Analyse (Fluorescence Activated Cell Sorting) gezeigt werden, dass mitotisch arretierte Zellen nach Gö6976-Behandlung aus der Mitose austreten. Zweitens konnte durch Westernblot-Analysen ein Abbau bestimmter mitotischer Proteine nach Gö6976-Behandlung nachgewiesen werden. Schließlich konnte durch Chromosomen-Spreitungs-Analysen gezeigt werden, dass Gö6976 eine Trennung der Schwesterchromatiden induziert. Diese drei experimentellen Ansätze bestätigen, dass Gö6976 zu einer Spindelcheckpoint-Inaktivierung führt.

Nachweis der Checkpoint-Inaktivierung durch FACS-Analyse

Durch MPM2-FACS-Analyse lässt sich der Anteil der mitotischen Zellpopulation an der Gesamtpopulation ermitteln. Die beiden Tumorzelllinien HCT116 (Colonkarzinom) und HeLa (Cervixkarzinom) wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von Gö6976 (0-5µM) inkubiert. Da der mitotische Populationsanteil von asynchron wachsenden Zellen maximal 2-5% beträgt, wurden die Zellen 14h mit Taxol (100nM) vorbehandelt. Taxol führt zu einer langdauernden Aktivierung des Spindelcheckpoints, der die Zellen in der Mitose arretiert. Durch einen „shake-off“ (Abschlagen der mitotischen Zellen, siehe auch Material und Methoden) wurde dann die mitotische Zellpopulation geerntet und diese mit aufsteigenden Konzentrationen von Gö6976 für 2h behandelt (Abb. 6).

Zur Arretierung in der Mitose wurden zwei verschiedene „Spindelgifte“ eingesetzt. Zum einen, wie bereits oben beschrieben, Taxol (100nM) und zum anderen Nocodazol (150nM). Letztere Substanz führt ebenfalls zu einer Aktivierung des Spindelcheckpoints, jedoch führt die Behandlung mit Nocodazol zur Depolymerisierung der Mikrotubuli. Da der Spindelcheckpoint sowohl durch fehlende Spannung als auch fehlenden Kontakt aktiviert wird, wurden experimentell zwei Spindel-Inhibitoren eingesetzt, die den Mechanismen der vermuteten Aktivierung Rechnung tragen.

Als Kontrolle wurde der CDK1-Inhibitor Roscovitin, der zu einem Austritt der Zellen aus der Mitose führt, eingesetzt (Senderowicz 2003).

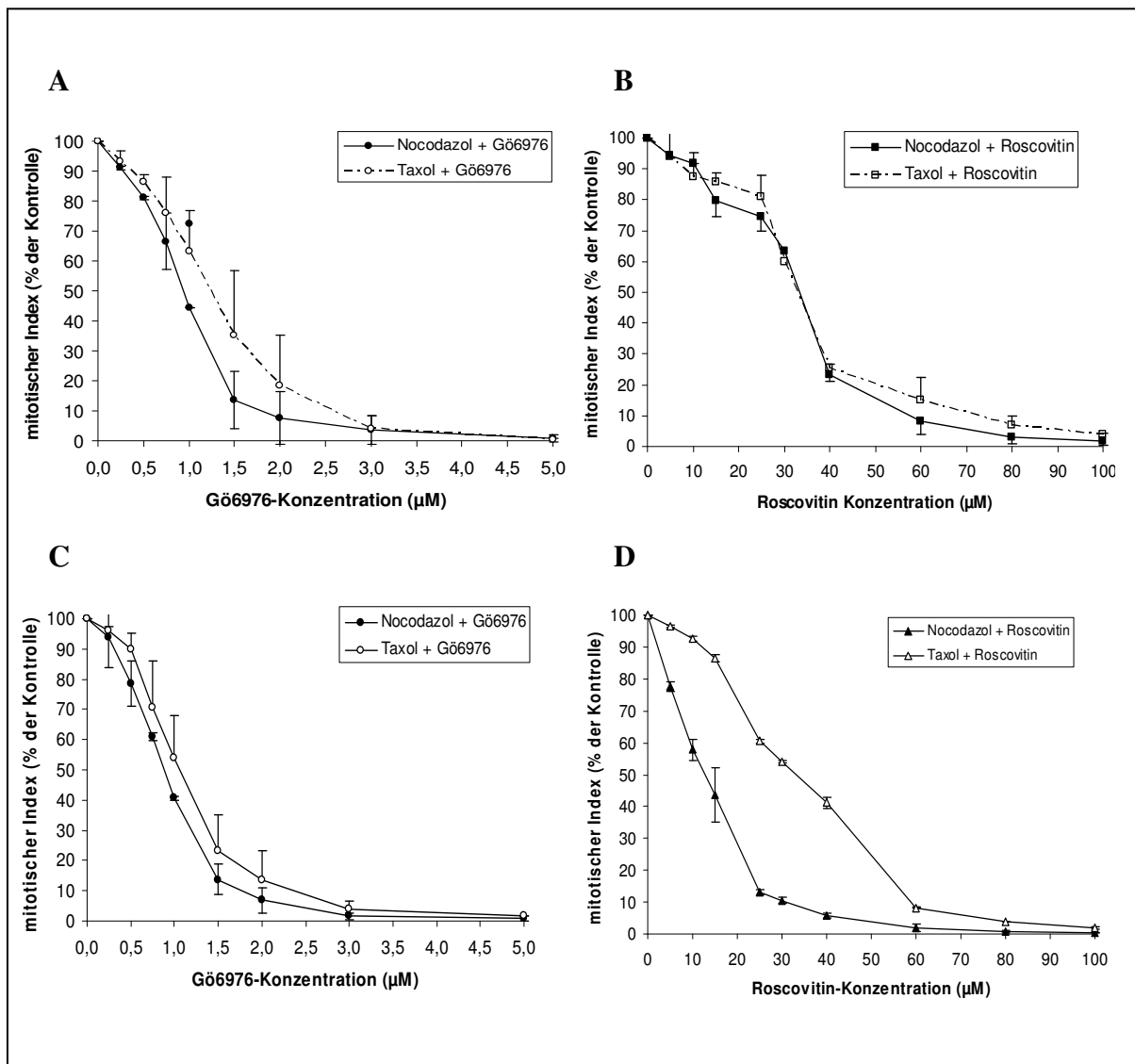


Abb.6: Konzentrationswirkungskurven von Gö6976 und Roscovitin in HeLa-Zellen und HCT116-Zellen

HeLa-Zellen wurden für 14h mit Nocodazol (150nM) oder Taxol (100nM) vorbehandelt und dann zusätzlich mit aufsteigenden Konzentrationen eines Inhibitors (Gö6976 [0-5 μM] oder Roscovitin [0-100 μM]) für 2h inkubiert. Zur Bestimmung der mitotischen Indizes wurden FACS-Analysen durchgeführt: **A+B**: HeLa-Zellen; **C+D**: HCT116-Zellen. Die Graphen stellen die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten dar.

In Abb.6 sind die Konzentrationswirkungskurven dargestellt. Der Inhibitor Gö6976 wurde im Konzentrationsbereich von 0 bis 5 μM getestet. Roscovitin wurde im Bereich von 0 bis 100 μM untersucht. Die IC₅₀-Werte wurden graphisch bestimmt. Für Gö6976

lagen die IC₅₀-Werte bei ca. 0,9µM in Nocodazol-arretierten Zellen und bei ca. 1,2µM in Taxol-arretierten HeLa-Zellen. In der HCT116-Zelllinie konnten ähnliche Werte bestimmt werden. Der IC₅₀-Wert lag nach Arretierung durch Nocodazol bei etwa 0,9µM und bei ca. 1,1µM in Taxol-arretierten HCT116-Zellen.

	Nocodazol		Taxol	
	RV (µM)	Gö6976(µM)	RV(µM)	Gö6976 (µM)
HCT116	≈13	≈0,9	≈33	≈1,1
HeLa	≈33	≈0,9	≈33	≈1,2

Tab.1: IC₅₀-Werte von Gö6976 und Roscovitin für einen induzierten mitotischen Austritt

Bei einem Vergleich der IC₅₀-Werte für Gö6976 zeigte sich, dass zwischen den getesteten Zelllinien kein signifikanter Unterschied besteht. Die Zellen treten abhängig von der Gö6976-Konzentration aus der Mitose aus. Berücksichtigt man die Größe der Standardabweichung (Abb. 6(A+B)) stellt man fest, dass sich die Werte der Nocodazol bzw. Taxol-arretierten Zellen bezüglich der Spindelcheckpoint-Inaktivierung durch Gö6976 kaum unterscheiden. Es zeigt sich jedoch eine graphisch sichtbare Tendenz, dass Nocodazol-arretierte Zellen schneller auf Gö6976 zu reagieren scheinen.

Die mit Roscovitin behandelten Zellen treten aufgrund der CDK1-Inhibition wie erwartet ebenfalls aus der Mitose aus. Der IC₅₀-Wert von Roscovitin liegt mit ca. 33µM sowohl für Nocodazol als auch für Taxol-behandelte Zellen aber deutlich höher als der IC₅₀-Wert von Gö6976. Dies könnte bedeuten, dass Gö6976 eine höhere Affinität zu seiner Zielstruktur aufweist als Roscovitin oder dass sich die intrazelluläre Anreicherung der beiden Inhibitoren unterscheidet. Eine andere mögliche Erklärung wäre, dass Gö6976 den Spindelcheckpoint durch einen wesentlich effizienteren Mechanismus inaktiviert. Es fällt auf, dass der IC₅₀-Wert von Roscovitin mit einem Wert von 13µM in Taxol-arretierten HCT116-Zellen sehr niedrig ist.

Aus den Konzentrationswirkungskurven lassen sich die effektiven Dosen zur Inaktivierung des Spindelcheckpoints ablesen. Als Standard-Dosierung zur Induktion eines Austritts aus der Mitose wurde daher in folgenden Experimenten die Endkonzentration von 2µM Gö6976 verwendet.

Spindelcheckpoint-Inaktivierung: Abbau mitotischer Proteine

Um zu zeigen, dass die Inaktivierung des Spindelcheckpoints mit einem Abbau bestimmter mitotischer Proteine einhergeht, wurden die mitotischen APC/C-Substratproteine Cyclin B und Securin anhand einer Westernblot-Analyse untersucht. Der Abbau dieser Proteine zeigt den Austritt der Zelle aus der Mitose an. Ebenso kann in diesem Experiment die zeitliche Abhängigkeit der Wirkung von Gö6976 überprüft werden. HeLa-Zellen wurden für 14h mit Nocodazol (150nM) oder Taxol (100nM) mitotisch arretiert und anschließend mit Gö6976 (2 μ M) inkubiert. Die Proteinmengen von Securin und Cyclin B wurden im Zeitverlauf ab dem Zugabezeitpunkt des Inhibitors $t_0 = 0\text{min}$ bis $t_4 = 120\text{min}$ im Intervall von 30min betrachtet.

Die Abb.7(B) zeigt, dass Securin und Cyclin B in Gö6976-behandelten HeLa-Zellen abgebaut werden. Etwa 60 min nach Beginn der Inkubation ist ein Absinken der Menge von Cyclin B und Securin zu beobachten. Nach 120 min sind Securin und Cyclin B fast vollständig abgebaut. Der mitotische Index wurde parallel zu den Zeitpunkten $t_0 = 0\text{min}$, $t_1 = 30\text{min}$, $t_2 = 60\text{min}$, $t_3 = 90\text{min}$ und $t_4 = 120\text{min}$ durch FACS-Analyse bestimmt. Der Proteinabbau korreliert mit dem zeitlichen Verlauf des mitotischen Index (Abb.7(D)). Im Vergleich zu den Gö6976-behandelten Zellen blieben die zur Kontrolle mit DMSO behandelten Zellen weiterhin in der Mitose. Die Menge der mitotischen Proteine und der mitotische Index blieben auf einem konstanten Niveau. Die Behandlung mit DMSO wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob das Lösungsmittel von Gö6976 einen Einfluss auf das Experiment hat.

Der Abbau der mitotischen Proteine ist ein weiterer Hinweis darauf, dass Gö6976 den Spindelcheckpoint inaktiviert und die Zellen im weiteren Verlauf aus der Mitose austreten. Es zeigt sich, dass Securin schneller abgebaut wird als Cyclin B. Des Weiteren zeigt sich, dass die durch Gö6976 induzierte Proteolyse der Proteine Securin und Cyclin B in Gegenwart von Spindelschäden erzeugt durch Nocodazol früher einsetzt als in Gegenwart von Taxol-induzierten Spindelschäden. Diese Beobachtung korreliert direkt mit der zeitlichen Abhängigkeit des mitotischen Austritts.

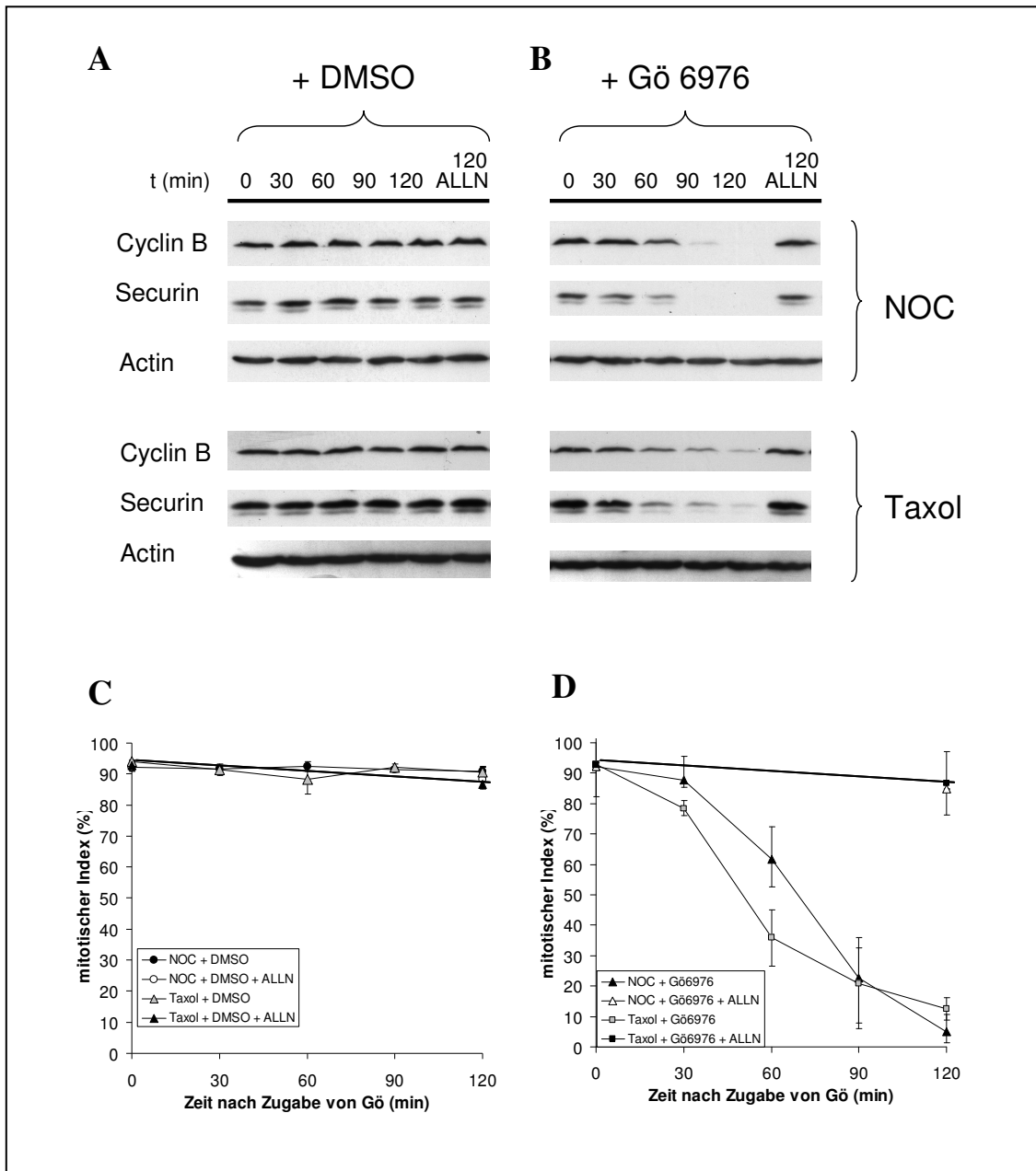


Abb.7: Gö6976-induzierte mitotische Proteinproteolyse in Gegenwart von Spindelbeschädigung

HeLa Zellen wurden mit Nocodazol (150nM) oder Taxol (100nM) für 14h behandelt. Dann folgte eine Inkubation mit Gö6976 (2 μ M). Im Zeitverlauf 0-120min (t_0 = Zugabezeitpunkt von Gö6976) wurden die Proteinmengen von Cyclin B und Securin betrachtet. Parallel hierzu wurde der mitotische Index gemessen. Zur Hemmung des Proteasoms wurde ALLN (200 μ M) eingesetzt. **A:** mitotische Proteinmenge von Securin und Cyclin B nach Zugabe von DMSO; **B:** mitotische Proteine Securin und Cyclin B nach Zugabe von 2 μ M Gö6976; **C:** mitotischer Index nach Zugabe von DMSO; **D:** mitotischer Index nach Zugabe von 2 μ M Gö6976. Die Graphen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten. Abgebildet sind repräsentative Westernblots (SDS-Gel 12%).

Spindelcheckpoint-Inaktivierung bei Proteasom-Blockade

Der Austritt aus der Mitose nach Spindelcheckpoint-Inaktivierung ist vom Proteasom abhängig. Die Zelle kann nicht aus der Mitose austreten, da für diesen Vorgang der Abbau von Cyclin B bzw. die Inaktivierung von CDK1 essentiell ist. Bringt man unter dieser Bedingung Gö6976 in die Zelle ein, ist anzunehmen, dass die Zelle in folgenden Zustand eintritt: Der Spindelcheckpoint wird inaktiviert, ein weiterer Austritt aus der Mitose ist aber aufgrund von bestehender CDK1-Cyclin B-Aktivität nicht möglich. Zur experimentellen Blockierung des Proteasoms wurde der Inhibitor ALLN eingesetzt (Abb. 7(A+B)). Nach 120min Inkubationszeit mit Gö6976 zeigte sich eine im Vergleich zum Ausgangszeitpunkt (92%) unveränderte Proteinmenge und der mitotische Index betrug nach 120min 84% (in HeLa-Zellen und in Gegenwart von Nocodazol).

Es konnte experimentell gezeigt werden, dass der Inhibitor Gö6976 bei funktionsfähigem Proteasom zum Austritt aus der Mitose führt (Abb.7). Unter Proteasom-Inhibition ist kein Austritt aus der Mitose zu beobachten. Der Austritt aus der Mitose kann durch Spindelcheckpoint-Inhibierung oder durch CDK-Inaktivierung geschehen. Um diese Mechanismen zu unterscheiden, soll im Folgenden der CDK-Inhibitor Roscovitin mit Gö6976 verglichen werden.

Gö6976 induziert eine vorzeitige Chromosomentrennung

Eine vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden zeigt eine Inaktivierung des Spindelcheckpoints an. Der Cohesin-Komplex, der die beiden Schwesterchromatiden miteinander verbindet, kann erst dann gespalten werden, wenn die spindelcheckpoint-abhängige Hemmung des APC/C beendet wird. Die Trennung der Schwesterchromatiden stellt zeitlich den Eintritt in die Anaphase dar. Geschieht die Trennung der Schwesterchromatiden bevor alle Kinetochore mit dem Spindelapparat verbunden sind, so spricht man von einer „vorzeitigen Anaphase“. An dieser Stelle steht die Frage im Fokus, ob es durch Gö6976 prinzipiell zu einer Trennung der Schwesterchromatiden kommt, was ein weiterer Hinweis darauf ist, dass Gö6976 eine Inaktivierung des Spindelcheckpoints induziert.

Es ist bekannt, dass Roscovitin durch Inhibierung von CDK1 zur Inaktivierung des Spindelcheckpoints und zu einer vorzeitigen Anaphase führt (Skoufias *et al.* 2007). Daher soll die Behandlung mit Roscovitin in diesem Experiment als Kontrolle dienen.

In diesen Experimenten wurden HCT116-Zellen für 6h mit Nocodazol (150nM) behandelt. Die mitotischen Zellen wurden anschließend durch einen „Shake-off“ ge-

erntet und in Medium, das entweder Roscovitin (40 μ M), Gö6976 (2 μ M) oder DMSO enthielt, resuspendiert. Die Zellen wurden zu den Zeitpunkten $t_1 = 10\text{min}$ und $t_2 = 15\text{min}$ nach Inhibitorzugabe geerntet. Um den Anteil der Zellen mit getrennten Schwesterchromatiden zu bestimmen, wurde eine Chromosomen-Spreitung durchgeführt. In der Abb. 8 sind typische Beispiele von Metaphasenchromosomen der Spreitungs-Analyse dargestellt. Nach Behandlung mit 2 μ M Gö6976 zeigen sich deutlich getrennte Schwesterchromatiden.

Wie erwartet konnte nach Roscovitin-Behandlung die vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden ebenfalls beobachtet werden, jedoch in weit geringerem Ausmaß. Der Anteil der durch Roscovitin induzierten vorzeitigen Chromatidentrennungen betrug 10min nach Inhibitorzugabe 3,6% und stieg auf 7,1% nach 15min. Gö6976 induzierte einen signifikant höheren Anteil an vorzeitigen Chromatidentrennungen. Es konnte ein Anteil von 13,5% nach 10min und 19,6% nach 15min bestimmt werden. Die mit DMSO inkubierten Zellen wiesen eine sehr niedrige Trennungsrate der Schwesterchromatiden auf.

Kann in diesem Experiment zwischen Spindelcheckpoint-Inhibierung und CDK-Inaktivierung unterschieden werden? Roscovitin inhibiert die CDK-Aktivität und die Behandlung führt zu vorzeitigen Chromatidentrennungen. Der Anteil der durch Gö6976-Behandlung induzierten Chromatidentrennungen ist jedoch wesentlich höher. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass die Wirkung von Gö6976 nicht durch eine CDK-Inaktivierung zu erklären ist. Darüber hinaus ist gezeigt, dass die Kinase-Aktivität von CDK1 *in vitro* nicht durch Gö6976 oder UCN-01 gehemmt wird (*Daten nicht gezeigt*, Vogel 2008).

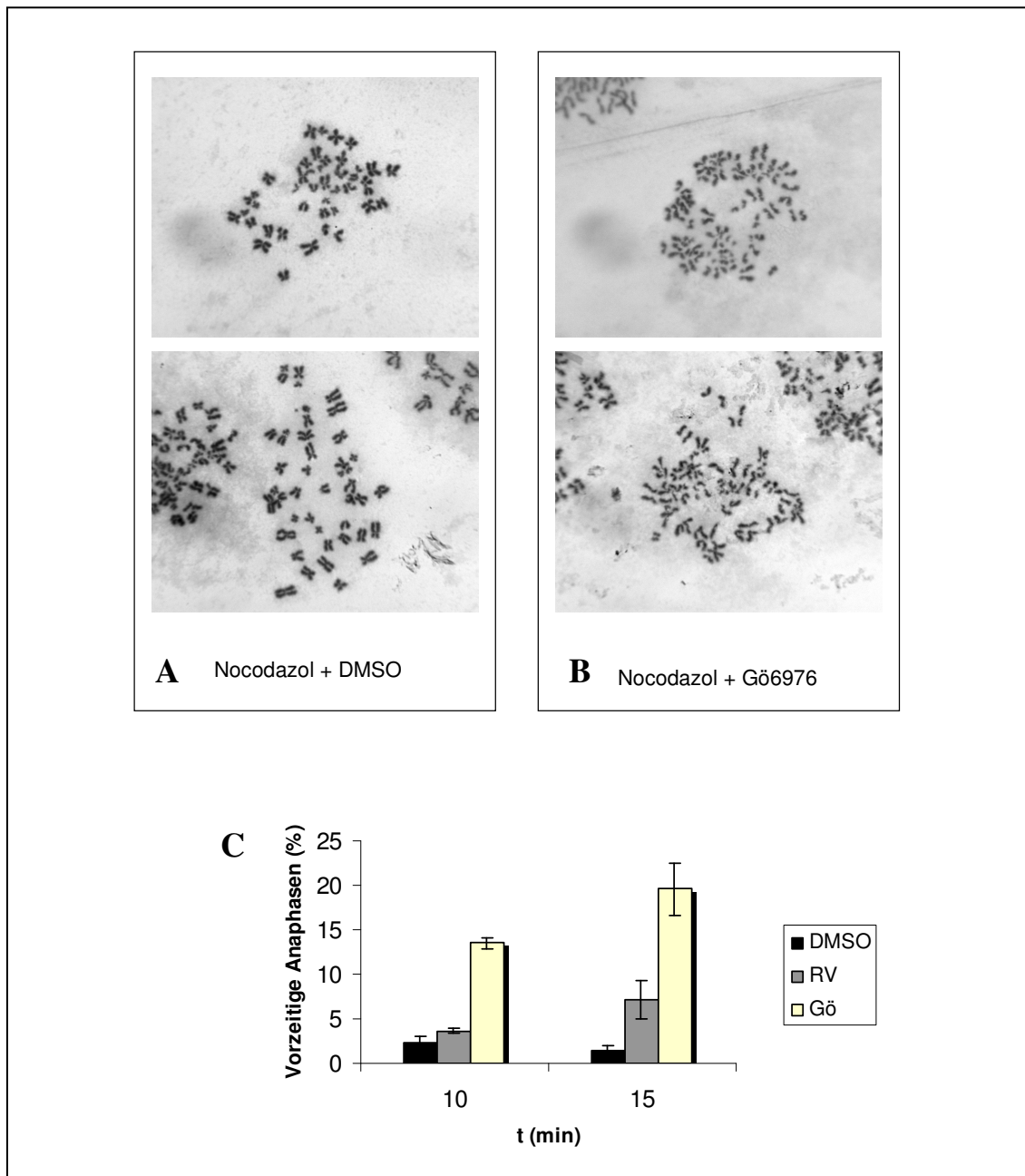


Abb.8: Vorzeitige Chromatidentrennung durch Gö6976

HCT116- Zellen wurden 6h mit Nocodazol behandelt. Die durch „Shake-off“ geernteten mitotischen Zellen wurden in Inhibitorhaltigem Medium (Gö6976 [2 μ M], Roscovitin [40 μ M]) resuspendiert. 10 und 15min nach Inhibitorzugabe wurde eine Chromosomen-Spreitung durchgeführt **A**: Nocodazol + DMSO; **B**: Nocodazol + 2 μ M Gö6976; **C**: Quantifizierung der vorzeitigen Chromosomentrennungen induziert durch 2 μ M Gö6976 und 40 μ M Roscovitin; Der Graph zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von zwei unabhängigen Experimenten.

4.2 Phänotypen einer pharmakologischen Spindelcheckpoint-Inhibierung

Gö6976-Behandlung induziert keine Kernanomalien in Form von Multinuklei

„Multinuklei“ sind definiert als Ansammlung mehrerer kleiner Zellkerne oder Zellkerne mit Lappenbildung. Eine Hemmung von Bub1 oder Mad1 führt zur Entstehung von Multinuklei (Taylor und McKeon 1997). Durch eine Teilsuppression von Mad2 oder BubR1 mittels siRNA konnten in HeLa-Zellen ebenfalls Multinuklei erzeugt werden (Kops *et al.* 2004, Michel *et al.* 2001).

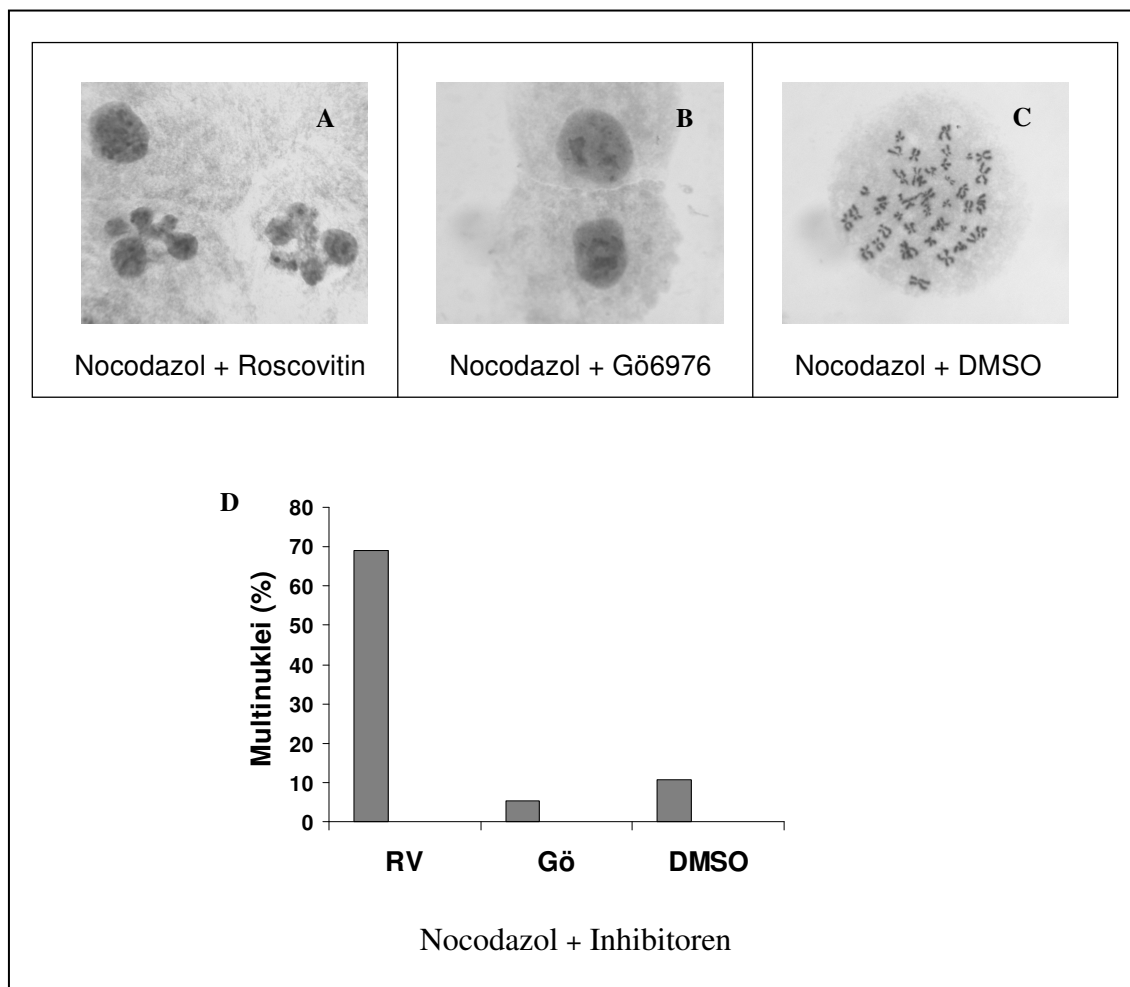


Abb.9: Bildung von Multinuklei

HCT116-Zellen wurden 6h mit Nocodazol vorbehandelt und die durch Shake-off geernteten mitotischen Zellen wurden in Inhibitorhaltigem Medium (Gö6976 [2µM], Roscovitin [40µM]) resuspendiert. 3h nach Inhibitorzugabe wurde eine Chromosomen-Spreitung durchgeführt **A:** Multinuklei nach Roscovitin-Behandlung; **B:** Gö6976-Behandlung erzeugt keine Multinuklei; **C:** DMSO-Behandlung; **D:** Quantifizierung der Multinuklei. Es wurden jeweils 100 Zellen gezählt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Es wurde untersucht, ob Gö6976 einen Multinuklei-Phänotyp induziert. Der experimentelle Versuchsaufbau entspricht dem zur Untersuchung der vorzeitigen Anaphasen. Es wurden HCT116-Zellen für 6h mit Nocodazol (150nM) vorinkubiert. Dann folgte eine Inkubationszeit von 3h mit Gö6976, Roscovitin (40µM) oder DMSO und eine Chromosomen-Spreitung wurde angeschlossen.

Es zeigt sich, dass Roscovitin eine Multinukleibildung in 69,1% aller Fälle induzierte. In Abb.9(A) sind zwei Zellen mit sogenannten Multinuklei induziert durch Roscovitin dargestellt. Es handelt sich um Zellkerne mit ausgeprägter Lappenbildung. Der Anteil der Multinuklei in mit DMSO kontrollbehandelten Zellen lag bei 10,8%. Die meisten Zellen der Kontrolle befanden sich jedoch weiterhin in der Metaphase. Die mit Gö6976 behandelten Zellen wiesen jedoch nur in 5,4% der Fälle Multinuklei auf (Abb.9(D)). Das Experiment zeigt, dass Gö6976 nicht zur Bildung von Multinuklei führt.

Beschleunigung der Mitose durch Behandlung mit Gö6976

Bei partieller Suppression von Mad2 und BubR1 durch siRNA ist eine beschleunigte Mitose zu beobachten. Kops und Kollegen zeigten, dass eine HeLa-Zelle ca. 33min von der Auflösung der Kernhülle bis zur vollständigen Anbindung aller Chromosomen benötigt (Kops *et al.* 2004). Von da an dauert es \approx 18min bis zum Eintritt in die Anaphase. Eine HeLa-Zelle mit reduzierter BubR1 oder Mad2-Menge trat nach ca. 20min in die Anaphase ein, obwohl Chromosomen teilweise nicht mit dem Spindelapparat verbunden waren. Diese Zelle trat insgesamt ungefähr 31min eher in die Anaphase ein als eine Zelle mit normaler BubR1- oder Mad2-Menge. Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch siRNA-Experimente, in denen eine Reduzierung der Mad2- und BubR1-Expression zu einer Beschleunigung der Mitose führt. Mad1 und Bub3 hatten dagegen keinen Einfluss auf den zeitlichen Ablauf der Mitose im Sinne einer Beschleunigung (Meraldi *et al.* 2004). Dennoch war unter Bub3- und Mad1-Suppression ein so genanntes „Misalignment“ der Chromosomen zu beobachten. Ebenso führte eine partielle Suppression von Mad2 im Gegensatz zu Mad1 zu einer beschleunigten Mitose (Kienitz *et al.* 2005).

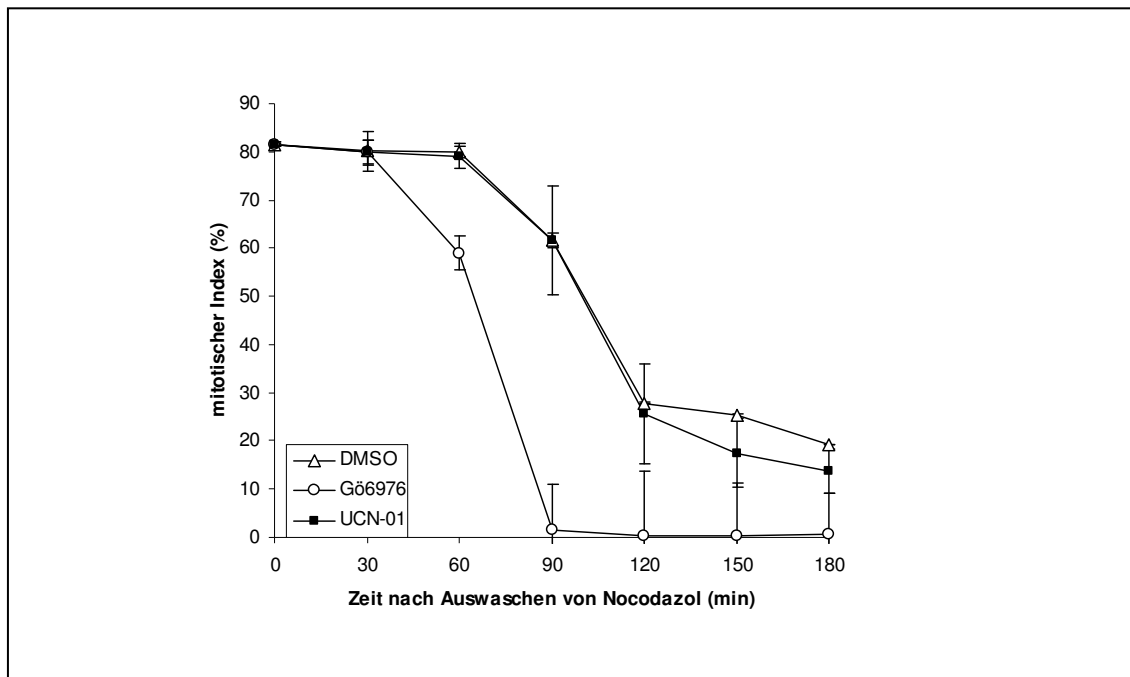


Abb.10: Gö6976 induziert eine Beschleunigung des Mitoseaustritts

HCT116-Zellen wurden über 14h mit Nocodazol (150nM) mitotisch arretiert, durch Shake-Off geerntet, nach mehrfachem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Zellen dann mit Inhibitorhaltigem Medium (Gö6976 [2 μ M]; UCN-01 [100nM]) inkubiert und der mitotische Index ab dem Zugabezeitpunkt der Inhibitoren im Zeitverlauf betrachtet. Das Experiment wurde zweifach durchgeführt und der Mittelwert daraus gebildet. Zusätzlich ist die Standardabweichung abgebildet.

Es wurde untersucht, ob durch Gö6976 eine beschleunigte Mitose induziert werden kann. Zur Klärung dieser Fragestellung wurden HCT116-Zellen mit Nocodazol mitotisch arretiert. Um den Zellen wieder einen Austritt aus der Mitose zu ermöglichen, wurde das Nocodazol-haltige Medium entfernt und die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen um auch das Nocodazol in den Zellen zu entfernen. Nach dem Auswaschen von Nocodazol wurden die Zellen in einem Gö6976-haltigen Medium resuspendiert und ausplattiert. Parallel dazu wurden Zellen mit DMSO- oder UCN-01-haltigem Medium resuspendiert. UCN-01 wurde als vergleichende Kontrolle eingesetzt, da UCN-01 eine Strukturähnlichkeit mit Gö6976 aufweist und die Checkpoint-Kinase Chk1 hemmt (Kohn *et al.* 2003). Der mitotische Index wurde dann durch MPM2-FACS-Analyse bestimmt und im Zeitverlauf betrachtet (Abb. 10).

Die DMSO-behandelten Zellen begannen nach ca. 60min aus der Mitose auszutreten. Nach 120min sank der mitotische Index auf 27,9%. Die mit UCN-01 behandelten Zellen folgten einer ähnlichen Dynamik. Der Austritt der ersten Zellen begann nach ca. 60min und der mitotische Index betrug nach 120min ebenfalls 25,6 %. Die mit Gö6976 behandelten Zellen traten deutlich früher aus der Mitose aus. Die ersten Zellen traten ca.

30min nach Auswaschen des Nocodazols aus der Mitose aus und nach 90min war der Austritt aus der Mitose annähernd vollständig abgeschlossen. Auch in HeLa-Zellen konnte eine ähnliche Kinetik beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).

Gö6976 induziert Chromosomen-Aufreihungsdefekte in der Mitose

Ein weiterer Phänotyp beschreibt die Aufreihungsdefekte der Chromosomen. Zur Überprüfung, ob und in welcher Form Gö6976 Chromosomen-Aufreihungsdefekte induziert, wurden HCT116-Zellen mit Gö6976 (2 μ M) behandelt. Anschließend wurden die Zellen fixiert und eine Immunfluoreszenz durchgeführt (in Zusammenarbeit mit Anne Kienitz, AG Bastians). Es wurden die Kinetochore mittels CREST-Antikörper und die DNA durch eine Höchst33258-Färbung markiert. Im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen, zeigten die Gö6976-behandelten Zellen z.T. eine massive Fehlverteilung der Chromosomen. Des Weiteren konnten „Chromosomen-Brücken“ beobachtet werden. Deutlich werden die mitotischen Chromosomen-Fehlverteilungen in der Anaphase (Abb. 11).

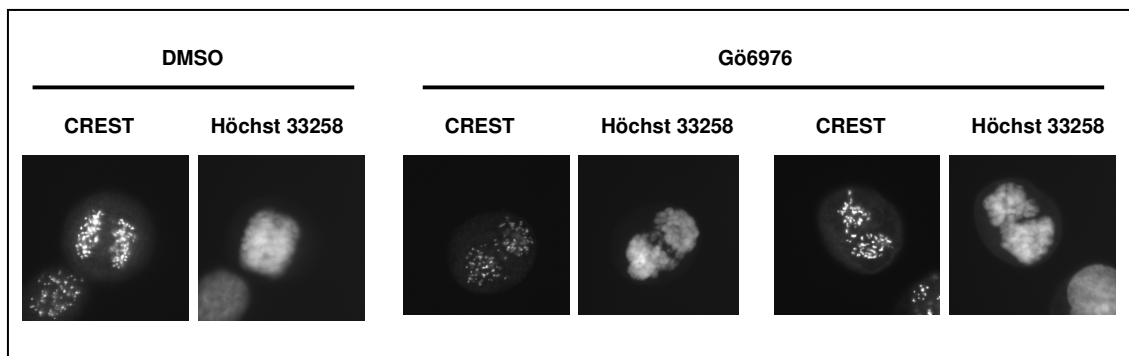


Abb.11: Aufreihungsdefekte durch Gö6976

HCT116-Zellen wurden auf polylysinisierten Deckgläsern ausgesät und für 4h mit 2 μ M Gö6976 oder DMSO behandelt und im Anschluss daran für eine Immunfluoreszenz mit 1% Paraformaldehyd (PFA) in PHEM fixiert. Die Kinetochore wurden mit CREST (humaner Anti-CREST-Antikörper) markiert, die DNA mit Höchst33258. Abgebildet sind Zellen in der Anaphase. (Leitz Axiovert 40 CFC Mikroskop (Leica, Wetzlar); Kamera: CCD Kamera Hamamatsu, Typ C4742-95 (Hamamatsu, Japan))

Gö6976 induziert transienten Arrest

Aufgrund der beobachteten Gö6976-induzierten Chromosomen-Aufreihungsdefekte wurde der Einfluss von Gö6976 auf asynchron wachsende HCT116-Zellen untersucht. Asynchron wachsende Zellen wurden für 4h mit Gö6976 in aufsteigenden Konzentrationen (0-5 μ M) behandelt.

Der Anteil der mitotischen Zellen wurde anschließend durch MPM2-FACS-Analyse bestimmt. Es konnte beobachtet werden, dass die Zellen in Abhängigkeit von der Gö6976-Konzentration mitotisch arretieren, was mit einer Akkumulation von fehlerhaften Chromosomenaufreihungen korreliert (Stolz *et al.* 2009). Bei einer Konzentration von 2 μM konnte ein Maximum an arretierten Zellen von 16% gemessen werden (Abb.12).

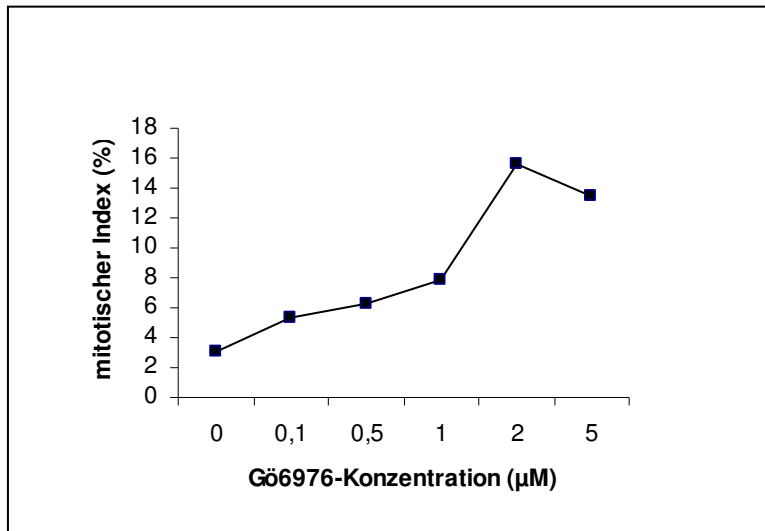


Abb.12: Gö6976 induziert einen transienten mitotischen Arrest

Asynchron wachsende HCT116-Zellen wurden 4h mit Gö6976 in aufsteigenden Konzentrationen behandelt (0-5 μM). Im Anschluss wurde der mitotische Index durch FACS-Analyse bestimmt. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

4.3 Untersuchung der molekularen Zielstruktur von Gö6976

Kinase-Assay

Die Struktur von Gö6976 zeigt, dass es als ATP-kompetitiver Inhibitor wirken könnte. Daher sollten Spindelcheckpoint-Kinasen auf die Wirkung von Gö6976 untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde aus dem Lysat mitotischer Zellen die endogene Kinase BubR1 immunpräzipitiert (Abb.13). Trotz mehrfacher Versuche konnte keine Aktivität der Kinase *in vitro* nachgewiesen werden. Daher konnte nicht gezeigt werden, ob die Aktivität durch Gö6976 hemmbar ist oder nicht. Gleiches gilt für Bub1 (Daten nicht gezeigt).

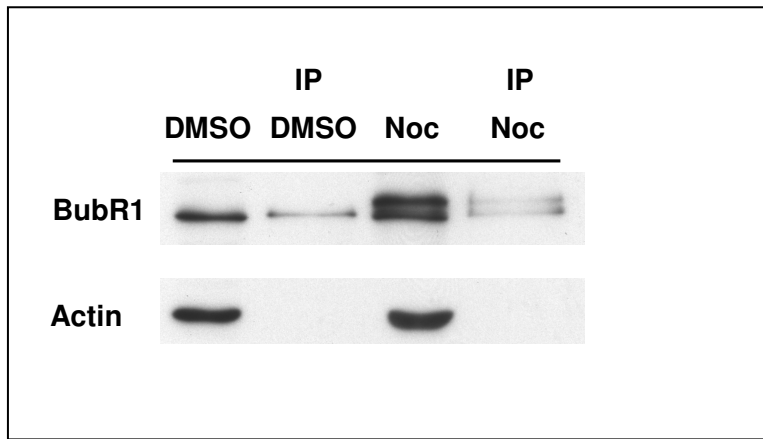


Abb. 13: Immunpräzipitation von endogener BubR1-Kinase

Die Kinase BubR1 wurde aus dem Zelllysate asynchron wachsender und Nocodazol-vorbehandelter (150nM, 14h) HCT116-Zellen mittels eines Anti-BubR1-Antikörpers (zur Verfügung gestellt von Taylor, S.S.) immunpräzipitiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Westernblot. Es wurde ein 8%iges SDS-Gel verwendet.

Phosphorylierungsstatus der Checkpoint-Kinasen

Um weitere Hinweise auf das Zielprotein von Gö6976 zu erhalten, wurde der Phosphorylierungsstatus der Checkpoint-Kinasen bei Inaktivierung des Spindelcheckpoints durch Gö6976 untersucht. Es ist bekannt, dass BubR1 bei Spindelcheckpointinaktivierung (in Abwesenheit von Spindelgiften) in phosphorylierter Form vorliegt (Taylor *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu ist Bub1 während einer normalen Mitose nicht phosphoryliert. Wird eine Mitose durch Spindelgifte wie Nocodazol oder Taxol gestört, so reagiert die Zelle mit einer Phosphorylierung von Bub1 (Taylor *et al.* 2001). Der Phosphorylierungsstatus von BubR1 ist unabhängig davon, ob der Spindelcheckpoint durch Spindelbeschädigung aktiviert wurde (Taylor *et al.* 2001). Es ist auch bekannt, dass Mps1 in der Mitose durch eine MAP Kinase phosphoryliert wird und dass diese Phosphorylierung für die Lokalisation von Mps1 in *Xenopus*-Eiextrakten am Kinetochor notwendig ist (Zhao und Chen 2006). Mps1 ist auch in humanen mitotischen Zellen phosphoryliert (Stucke *et al.* 2002).

Der Phosphorylierungsstatus von Bub1, BubR1 und Mps1 wurde mittels Westernblot-Analyse in An- oder Abwesenheit von Gö6976 überprüft. Dazu wurden HeLa-Zellen über einen Zeitraum von 14h mit Nocodazol (150nM) mitotisch arretiert und für 2h mit Gö6976 (2µM) oder UCN-01 (100nM) behandelt. Zusätzlich wurde der Proteasom-Inhibitor ALLN (200µM) eingesetzt, um einen Austritt der Zellen aus der Mitose zu verhindern. Die Zellen wurden lysiert und die Proteine BubR1, Bub1 und Mps1 analysiert. In Lysaten von asynchron wachsenden Zellen wurde eine einzelne Bande für BubR1, Bub1 und Mps1 nachgewiesen (Abb.14).

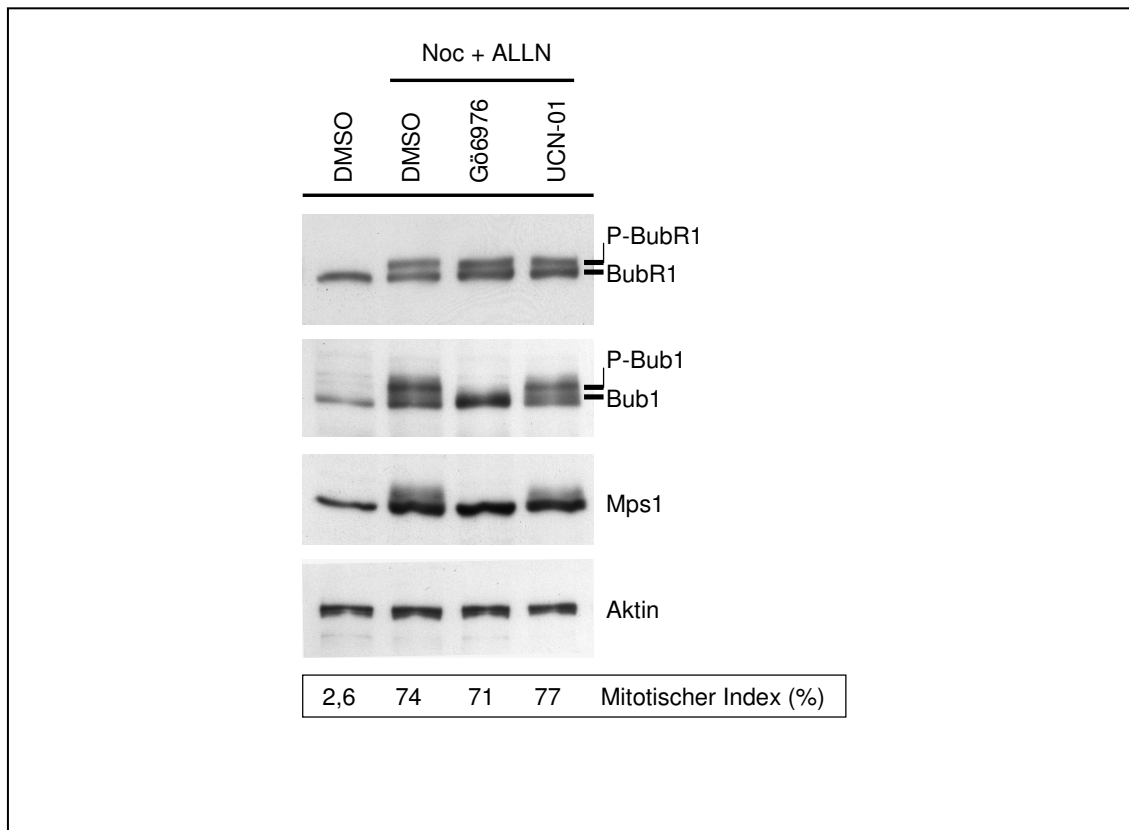


Abb.14: Gö6976 induziert eine Dephosphorylierung von Bub1 und Mps1, aber nicht von BubR1

HeLa-Zellen wurden für 14h mit Nocodazol (150nM) behandelt und dann für 2h mit den Inhibitoren Gö6976 (2µM) + ALLN, UCN-01 (100nM) oder DMSO inkubiert. Der mitotische Index wurde durch FACS-Analyse kontrolliert. Gezeigt ist der Westernblot eines repräsentativen Experiments. Es wurden folgende Antikörper verwendet: Anti-Bub1-Antikörper SB1.3, Anti-BubR1-Antikörper SBR1, TTK (C-19): sc 540, monoklonaler Anti-β-Aktin-Antikörper.

Dies ist bedingt durch den geringen Anteil mitotischer Zellen in einer asynchron wachsenden Zellpopulation. In den mitotisch arretierten Zelllysaten liegen die genannten Proteine in phosphorylierter Form vor. Durch den Phosphat-Rest verändert sich das Laufverhalten des Proteins in der Gelelektrophorese im Vergleich zu dem nicht-phosphorylierten Protein. Aus diesem Grund sind hier zwei Banden für BubR1, Bub1 und Mps1 detektierbar. Interessanterweise ist in Lysaten von Gö6976-behandelten Zellen ein deutlicher Verlust der Phosphorylierung von Bub1 detektierbar. Auch die Phosphorylierung von Mps1 ist vermindert, im Gegensatz zur Phosphorylierung von BubR1, die auch unter dem Einfluss von Gö6976 erhalten bleibt. Dagegen zeigt UCN-01 keinen Einfluss auf den Phosphorylierungsstatus von Bub1, BubR1 oder Mps1 (Abb.14).

Gö6976 induziert eine Delokalisation der Checkpoint-Kinasen

In der Prometaphase beginnen die Spindelcheckpoint-Komponenten am Kinetochor zu akkumulieren. Dabei stellt Aurora B den zentralen Faktor für die Rekrutierung der Spindelcheckpoint-Komponenten zum Kinetochor dar (Vigneron *et al.* 2004). Aurora B liegt in einem Komplex mit INCENP und Survivin vor. Es wird angenommen, dass Aurora B für die Funktion des Spindelcheckpoints notwendig ist, da Aurora B die Lokalisation von Mps1, Bub1, CENP-E, Bub3, Mad1 und Mad2 am Kinetochor induziert. Darüber hinaus beeinflussen sich die Checkpoint-Komponenten auf vielfältige Weise gegenseitig. BubR1 und Bub1 benötigen beispielsweise Bub3 für die Lokalisation am Kinetochor (Taylor *et al.* 1998). Die Delokalisation der Checkpoint-Proteine vom Kinetochor spricht für eine Inaktivierung des Spindelcheckpoints.

Um zu testen, ob Gö6976 einen Einfluss auf die Lokalisation der Checkpoint-Komponenten *in vivo* hat, wurden HCT116-Zellen mit Nocodazol (4h; 150nM) mitotisch arretiert und anschließend mit Gö6976 (2µM) behandelt. Gleichzeitig wurden die Zellen mit ALLN (200µM) inkubiert, um einen Austritt aus der Mitose zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen fixiert und die Checkpoint-Kinasen Bub1 oder BubR1 durch einen spezifischen Antikörper immunhistochemisch angefärbt. Gleichzeitig wurde eine Färbung mit einem CREST-Antikörper durchgeführt, um die Kinetochore zu markieren. Die DNA wurde durch eine Höchst33258-Färbung fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht. In mitotisch arretierten HCT116-Zellen ist wie erwartet eine Übereinstimmung der Signale von BubR1 und Bub1 mit dem Signal des Kinetorchors zu beobachten (*Daten nicht gezeigt*, Stolz *et al.* 2009).

Dies bedeutet, dass sowohl BubR1 als auch Bub1 in mitotischen Zellen am Kinetochor lokalisiert sind. Parallel zu Gö6976 wurden HCT116-Zellen mit dem Inhibitor ZM447439 behandelt. Dieser Inhibitor inaktiviert die Kinase Aurora B. Es konnte nachvollzogen werden, dass die Hemmung von Aurora B zu einer Delokalisation von Bub1 und BubR1 vom Kinetochor führt. Im Vergleich dazu induziert Gö6976 eine Abschwächung der Kinetochorlokalisation der beiden Kinasen (*Daten nicht gezeigt*, Stolz *et al.* 2009).

5 Diskussion

Inaktivierung des Spindelcheckpoints

Die Behandlung mit der Indolocarbazol-Substanz Gö6976 führt zu einer Inaktivierung des Spindelcheckpoints in humanen Karzinom-Zelllinien (gezeigt in HeLa und HCT116-Zellen; Abb.6). Es konnte durch FACS-Analyse gezeigt werden, dass mitotisch arretierte Zellen abhängig von der Gö6976-Konzentration aus der Mitose austreten. Gleichzeitig wurde ein Proteasomabhängiger Abbau mitotischer Proteine (Cyclin B und Securin) beobachtet, der ebenfalls den Austritt aus der Mitose anzeigt. Darüber hinaus zeigte eine Chromosomen-Spreitungs-Analyse, dass eine Behandlung mit Gö6976 eine vorzeitige Trennung der Schwesterchromatiden induzierte.

5.1 Die Suche nach dem Zielprotein von Gö6976

Ein zentraler Diskussionspunkt ist die Zielstruktur von Gö6976 im Kontext der Spindelcheckpoint-Inaktivierung. Es konnte experimentell kein eindeutiger Beleg für die Zielstruktur erbracht werden, daher müssen nun die Experimente und Phänotypen, die durch Gö6976 induziert werden, auf Hinweise bezüglich der Zielstruktur untersucht werden.

Es ist bekannt, dass Gö6976 bestimmte Subtypen der Proteinkinase C (PKC) inhibiert, indem Gö6976 mit der ATP bindenden Domäne der Kinase interagiert (Kohn 2003). Es liegt nahe, zu vermuten, dass Gö6976 zusätzlich eine Proteinkinase des Spindelcheckpoints durch Bindung an die ATP-Domäne inhibiert. Als mögliche Zielstruktur von Gö6976 kommen Komponenten des Spindelcheckpoints in Betracht, die eine Kinase-Aktivität aufweisen (Tab.2).

Ausschluss von CDK1 und Chk1 als Zielstruktur von Gö6976

CDK1 konnte als Zielstruktur von Gö6976 ausgeschlossen werden. Zum einen unterscheiden sich die Inhibitor-induzierten Phänotypen. Der CDK1-Inhibitor Roscovitin induziert beispielsweise Multinuklei im Gegensatz zu Gö6976. Zum anderen haben weitere Experimente der Arbeitsgruppe gezeigt, dass Gö6976 die Kinase-Aktivität von CDK1 *in vitro* nicht beeinträchtigt (Stolz *et al.* 2009).

Ebenso kann Chk1 als Ziel von Gö6976 ausgeschlossen werden. Der Chk1-Inhibitor führt im Vergleich zu Gö6976 nicht zu einer beschleunigten Mitose (Abb.10).

BubR1 (Bub1) als mögliche Zielstruktur von Gö6976

Aufgrund der experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit scheint zunächst BubR1 als Zielstruktur von Gö6976 im Vordergrund zu stehen, obwohl weitere Ergebnisse der Arbeitsgruppe belegen, dass Aurora B die Zielstruktur von Gö6976 ist. Welche Hinweise sprechen nun für BubR1 als Zielstruktur? Grund zu dieser Annahme liefert die gestörte „timing“-Funktion der Mitose, die bei Behandlung mit Gö6976 auftritt. Analog dazu führt eine Reduktion der BubR1-Proteinmenge zu einer Beschleunigung der normalen Mitose (Meraldi *et al.* 2004). Darüber hinaus kommt es bei Reduktion von BubR1 zur vorzeitigen Trennung der Schwesterchromatiden und es sind Aufreihungsdefekte sowie Aneuploidisierung im Zusammenhang mit diesem Protein bekannt (Bohers *et al.* 2008). Der Phosphorylierungsstatus von BubR1 ändert sich nicht durch Gö6976-Behandlung (Abb.14), aber es ist auch gezeigt, dass die Phosphorylierung von BubR1 nicht mit der Kinase-Aktivität korreliert (Morrow *et al.* 2005). Der konstante Phosphorylierungsstatus von BubR1 widerspricht also nicht der These, dass Gö6976 BubR1 inhibiert.

Der Phänotyp „beschleunigte Mitose“ ist in der Literatur aber nicht nur im Zusammenhang mit BubR1, sondern auch mit Mad2 bekannt (Kops *et al.* 2004, Meraldi *et al.* 2004, Kienitz *et al.* 2005). Die Rolle von Bub1 ist im Kontext einer „beschleunigten Mitose“ kontrovers. Es ist jedoch anzumerken, dass Gö6976 eine Beschleunigung der Mitose nach Spindelschaden-induziertem Arrest herbeigeführt hat. Zur Akkumulation mitotischer Zellen wurde Nocodazol (150nM) eingesetzt, nach 14h wieder entfernt und die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen. Gö6976 beschleunigt also genauer gesagt den Austritt aus einem durch Spindelschaden induzierten mitotischen Arrest. Daher ist auch denkbar, dass Gö6976 eine „Stress-Kinase“, die aufgrund von Spindelschaden den Checkpoint aktiviert, hemmt, beispielsweise eine MAPK-Kinase. Konsequenterweise sollte daher die Wirkung von Gö6976 auf eine „normale“ Mitose untersucht werden. Insgesamt spricht der Phänotyp „beschleunigte Mitose“ dafür, dass BubR1 an dem Mechanismus der Spindelcheckpoint-Inhibierung durch Gö6976-Behandlung beteiligt ist.

Bub1 ist strukturell eng mit BubR1 verwandt und es sind Aneuploidie sowie eine vorzeitige Chromatidentrennung bei Reduktion von Bub1 bekannt (Schliekelman *et al.* 2009).

Kinase	Funktion	Substrat	Quelle
Aurora B	Chromosomal passenger complex, bipolare Anheftung der Chromosomen, Spindelcheckpoint-Aktivierung, Zytokinese	Histon H3	(Taylor <i>et al.</i> 2004) (Vader <i>et al.</i> 2006) (Gadea 2006) (Ditchfield <i>et al.</i> 2003)
Bub1	Spindelcheckpoint-Funktion, Chromosomenaufreihung	Cdc20	(Tang <i>et al.</i> 2004)
BubR1	Spindelcheckpoint-Funktion, Mikrotubuli-Kinetochor-Anheftung, „Timing“-Funktion in der Mitose (keine Kinaseaktivität in Hefe)	Kein Zielprotein bekannt Autophosphorylierung (in Anwesenheit von CENP-E)	(Musacchio und Hardwick 2002) (Mao <i>et al.</i> 2003) (Meraldi <i>et al.</i> 2004)
Chk1	Spindelcheckpoint-Funktion, Lokalisation von BubR1 am Kinetochor	Aurora B, BubR1	(Zachos <i>et al.</i> 2007)
MAPK	Spindelcheckpoint-Funktion, ist angereichert an ungebundenen Kinetochoren	Mps1, Cdc20, Bub1	(Zhao und Chen 2006) (Chung und Chen 2003) (Chen 2004)
Mps1	Spindelcheckpoint-Funktion, Lokalisation der Checkpoint-Kinasen Bub1, Bub3, Mad1 und Mad2 am Kinetochor	Mad1 (in <i>S.cerevisiae</i>), Borealin, Autophosphorylierung	(Hardwick <i>et al.</i> 1996) (Jelluma <i>et al.</i> 2008) (Kang <i>et al.</i> 2007)
Plk1	Zentrosomenreifung, Aufbau des Spindelapparats, Chromatidentrennung, Aktivierung von APC/C, Zytokinese, Spindelcheckpoint-Aktivierung	APC/C in vitro	(Strebhardt und Ullrich 2006) (van Vugt und Medema 2005) (Kotani <i>et al.</i> 1998) (Golan <i>et al.</i> 2002)
Tao1	Regulation der Spindeldynamik, Spindelcheckpointfunktion	Kein Zielprotein bekannt	(Draviam <i>et al.</i> 2007)

Tab.2: Kinasen, die möglicherweise im Zusammenhang mit der Funktion des Spindelcheckpoints stehen

In der Literatur ist ebenfalls beschrieben, dass Bub1 bei einer gleichzeitigen Inaktivierung von Aurora B zu einem schnelleren Austritt aus der Mitose führt (Morrow *et al.* 2005). In der Tat gibt es nun neben BubR1 und Bub1 ein weiteres Protein, welches zu einer beschleunigten Mitose führen kann: Aurora B.

Aurora-Kinasen werden durch Gö6976 inhibiert

Die meisten Hinweise und weitere Ergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass Aurora A und Aurora B durch Gö6976 inhibiert werden. Aurora B ist ein „chromosomal passenger protein“, das in verschiedene Prozesse der Mitose involviert ist. U.a. ist Aurora B an der Chromosomensegregation und an der Zytokinese beteiligt (Ditchfield *et al.* 2003, Fu *et al.* 2007). In der Mitose liegt Aurora B in einem Komplex mit Borealin, INCENP und Survivin vor (Adams *et al.* 2001). Die Kinase-Aktivität scheint für die Funktion des Spindelcheckpoints notwendig zu sein. Eine Hemmung der Kinase-Aktivität durch ZM447439 verursacht Defekte bei der Anheftung der Chromosomen (Ditchfield *et al.* 2003). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass eine ZM447439-Behandlung nach einem Nocodazol-Arrest zu einer beschleunigten Mitose führt und es zu einer „vorzeitigen Anaphase“ kommt (Taylor *et al.* 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zusätzlich, dass es durch ZM447439 zu einer Delokalisation der Checkpointproteine BubR1 und Bub1 vom Kinetochor kommt. Dies stimmt mit dem Effekt einer Gö6976-Behandlung auf die Lokalisation der Checkpointproteine überein.

Andere Effekte, die durch ZM447439 hervorgerufen werden, stimmen wiederum nicht mit den durch Gö6976-Behandlung hervorgerufenen Phänotypen überein. Beispielsweise kommt es durch ZM447439 zu einer Dephosphorylierung von BubR1. Im Fall eines Spindelschadens wird BubR1 phosphoryliert (Chan *et al.* 1999, Taylor *et al.* 2001). Eine Phosphorylierung von BubR1 ist aber nicht absolut essentiell für die Funktion des Spindelcheckpoints (Taylor *et al.* 2001). Im Gegensatz zu ZM447439 zeigt sich durch Gö6976 keine Dephosphorylierung von BubR1, sondern eine Dephosphorylierung von Bub1, welche essentiell für die Checkpointfunktion ist (Taylor *et al.* 2001). Diese widersprüchlichen Beobachtungen lassen sich beispielsweise dadurch erklären, dass Gö6976 zwei Kinasen, nämlich Aurora A und Aurora B, hemmt. ZM447439 dagegen inhibiert nur Aurora B.

Weitere Experimente der Arbeitsgruppe haben eindeutig gezeigt, dass Gö6976 *in vitro* die Kinasen Aurora A ($IC_{50} = 120\text{nM}$) und Aurora B ($IC_{50} = 100\text{nM}$) hemmt. Es konnte keine Inhibition von Bub1, Mps1 und Plk1 durch Gö6976 *in vitro* nachgewiesen werden (Stolz *et al.* 2009).

Mps1-Kinase wird nicht durch Gö6976 gehemmt

Auch die Kinase-Aktivität von Mps1 ist notwendig für die Funktion des Spindelcheckpoints (Abrieu *et al.* 2001). Für die Checkpointfunktion von Mps1 sind sowohl

Phosphorylierungsstatus als auch die Kinase-Aktivität von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Mps1 an S844 für die Lokalisation der Spindelcheckpointproteine Bub1, Bub3, Mad1, Mad2 am Kinetochor wichtig ist (Abrieu *et al.* 2001, Vigneron *et al.* 2004, Zhao und Chen 2006). Es ist allerdings auch bekannt, dass die Phosphorylierung an S844 keinen Einfluss auf die Kinase-Aktivität von Mps1 hat. Folglich sind beide Parameter, die Kinase-Aktivität und die Phosphorylierung, notwendig für die Rekrutierung der Spindelcheckpointproteine zum Kinetochor (Zhao und Chen 2006).

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Gö6976-Behandlung zu einer Dephosphorylierung von Mps1 führt. Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, dass eine Dephosphorylierung von Mps1 bzw. die Expression einer nicht phosphorylierbaren Mutante zu einer Delokalisation der Checkpointproteine vom Kinetochor führt (Zhao und Chen 2006). Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass in Gö6976-behandelten Zellen eine Delokalisation der Checkpoint-Kinasen vom Kinetochor stattfindet. Mps1 hätte also durchaus als Zielstruktur von Gö6976 in Frage kommen können.

Vergleicht man nun die durch Gö6976 erzeugten Phänotypen mit den Phänotypen erzeugt durch einen „small molecule inhibitor“ (SP600125, Schmidt *et al.* 2005), der Mps1 hemmt, so lassen sich deutliche Übereinstimmungen feststellen. SP600125 hemmt Mps1 über die Bindung an der ATP-Bindetasche. Dieser Inhibitor führt wie Gö6976 zu einem Austritt der Zellen aus einem Spindelschaden-induzierten Arrest. Die Proteinmenge von BubR1 am Kinetochor ist unter SP600125-Behandlung deutlich reduziert. Allerdings liegt BubR1 bei SP600125 in dephosphorylierter Form vor. Im Gegensatz dazu bleibt die Hyperphosphorylierung von BubR1 bei Gö6976-Behandlung erhalten und stattdessen ist Bub1 dephosphoryliert. Dieser direkte Vergleich von zwei „small molecule inhibitors“ ist sehr aufschlussreich, denn bei einem Vergleich von siRNA-Phänotypen mit dem Effekt durch „small molecule inhibitors“ muss bedacht werden, dass durch das Fehlen der strukturellen Komponente ein zusätzlicher Effekt besteht. Nimmt ein Protein beispielsweise eine strukturelle Funktion am Kinetochor ein, so hat eine Reduktion der Protein-Menge zur Folge, sodass der Proteinkomplex auseinander bricht und es zu einer Delokalisation der Checkpoint-Kinasen vom Kinetochor kommt. Ein „small-molecule-inhibitor“ dagegen führt lediglich zu einem Funktionsausfall der Kinase-Aktivität. Die inhibierte Kinase bleibt aber weiterhin Bestandteil des Proteinkomplexes.

Neben den bekannten Kinasen, könnte Gö6976 auch eine Kinase hemmen, die bisher im Zusammenhang mit der Spindelcheckpoint-Funktion unbekannt ist. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, dass Gö6976 keine Kinase zum Ziel hat, sondern ein Molekül, das zu einem anderen Zweck ATP umsetzt und daher ebenfalls die Struktur einer ATP-bindenden Tasche besitzt. Beispielsweise könnte das Kinesin Eg5, ein mikrotubuliabhängiges Motorprotein, inhibiert werden.

Verifizierung des Zielmoleküls durch einen Kinase-Assay

Letztlich wurde das Zielmolekül von Gö6976 durch weitere Experimente der Arbeitsgruppe verifiziert (Stolz *et al.* 2009). Die Kinase-Aktivität der Checkpoint-Kinasen wurde *in vitro* mittels eines Kinase-Assays untersucht.

Es wurde bereits versucht, einen BubR1-Kinase-Assay im Rahmen dieser Arbeit zu etablieren. Es konnte jedoch keine Kinase-Aktivität *in vitro* gemessen werden. Der Versuch, die Kinase-Aktivität durch Optimierung der Versuchsbedingungen messbar zu machen, war ebenfalls nicht erfolgreich. Es wurden dabei verschiedene Salzkonzentrationen, Temperaturen und Inkubationszeiten getestet. Die Kinase wurde aus HCT116-Zellen und HeLa-Zellen immunpräzipitiert. Sowohl endogene Kinase als auch überexprimierte Kinase wurde für den Kinase-Assay eingesetzt. Die Effektivität der Immunpräzipitation wurde durch Westernblot kontrolliert (Abb.13). Es ist vorstellbar, dass für die Aktivität der Kinase strukturelle Cofaktoren notwendig sind. Z.B. ist bekannt, dass CENP-E eine aktivierende Funktion gegenüber BubR1 besitzt (Mao *et al.* 2003). Bub3 könnte ebenfalls einen Cofaktor darstellen. Bub3 ist für die Lokalisation von BubR1 und auch Bub1 am Kinetochor erforderlich (Taylor *et al.* 1998). Ob Bub3 darüber hinaus eine aktivierende Funktion hat, ist unbekannt.

Zusätzlich zu einer Hemmung *in vitro* muss auch eine Hemmung *in vivo* gezeigt werden. Durch Überexpression der Zielstruktur in der Zelle wären die Phänotypen, die durch Gö6976 entstehen, unterdrückbar. Eine Überexpression von Bub1 oder ggf. BubR1 sollte die Sensitivität bezüglich einer Inaktivierung des Spindelcheckpoints durch Gö6976 senken. Eine elegantere Methode wäre die Expression einer Gö6976-resistenten Mutante (z.B. eine Mutation von BubR1) und eine gleichzeitige Reduktion des endogenen Proteins durch siRNA.

5.2 Phänotypen erzeugt durch Behandlung mit Gö6976

Behandlung mit Gö6976 induziert keine Multinuklei

Der Phänotyp „Multinuklei“ ist relativ unspezifisch und mit diversen Proteinen des Spindelcheckpoints assoziiert. Die Hemmung folgender Checkpoint-Komponenten führt also zur Bildung von Kernstrukturanomalien: Bub1 (Taylor und McKeon 1997), BubR1 (Kops *et al.* 2004), Mad1 und Mad2 (Jin *et al.* 1998, Michel *et al.* 2001, Kienitz *et al.* 2005). Darüber hinaus ist der Mechanismus, wie die Multinuklei entstehen, in der Literatur nicht hinreichend erklärt. Es ist interessant, dass Gö6976 nicht zur Bildung von Multinuklei führt. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass Gö6976 sehr spezifisch die Funktion einer Zielstruktur, möglicherweise in einem Subkompartiment, der Zelle hemmt. Dies gilt für den Fall, dass eine der oben beschriebenen Komponenten durch Gö6976 inhibiert wird. Auf diese Weise lässt sich erklären, warum es bei Inaktivierung einzelner Spindelcheckpoint-Komponenten zur Bildung von Multinuklei kommt, aber eine Gö6976-Behandlung keine Multinuklei induziert. Das Ausbleiben von Multinuklei bedeutet offensichtlich, dass die Prozesse der Zytokinese und der Wiederaufbau der Kernmembran, an denen Spindelcheckpoint-Komponenten über ihre eigentliche Funktion hinaus beteiligt sind, trotz Gö6976-Behandlung weitgehend ungestört ablaufen. Darüber hinaus gibt es Checkpoint-Komponenten, die noch nicht bezüglich ihres Einflusses auf die Bildung von Multinuklei untersucht worden sind. Gö6976 könnte aber auch eine Spindelcheckpoint-Komponente inhibieren, die nicht am Wiederaufbau des Kerns beteiligt ist. Letzlich hat der Multinuklei-Phänotyp also wenig Aussagekraft bezüglich der Zielstruktur von Gö6976. Ist aber umgekehrt die Zielstruktur bekannt, so kann man eine Aussage über den Wirkmechanismus von Gö6976 treffen.

Induktion eines transienten mitotischen Arrests durch Gö6976

Ein transienter mitotischer Arrest scheint zunächst im Widerspruch zur inhibitorischen Wirkung von Gö6976 auf den Spindelcheckpoint zu stehen. Behandelt man asynchron wachsende Zellen mit Gö6976, arretieren die Zellen in Abhängigkeit von der Konzentration in der Mitose (Abb.12). Dieser Widerspruch lässt sich durch die Aufreihungsdefekte, die durch Gö6976 ausgelöst werden, erklären. Initial wird also der Spindelcheckpoint durch Gö6976 infolge der Aufreihungsdefekte aktiviert. Da Gö6976 jedoch gleichzeitig den Spindelcheckpoint inaktiviert, können die Zellen nicht in einem stabilen und lang andauernden Arrest verbleiben.

Gö6976 induziert Aufreihungsdefekte in der Mitose

Aufreihungsdefekte sind ebenfalls im Zusammenhang mit fast allen bekannten Spindelcheckpoint-Komponenten beschrieben: Bub1 (Meraldi und Sorger 2005); BubR1; Bub3 (Logarinho *et al.* 2008); Plk1 (Matsumura *et al.* 2007); Aurora A (Sasai *et al.* 2008); Aurora B (Ditchfield *et al.* 2003). Unter Gö6976-Behandlung sind Aufreihungsdefekte zu beobachten.

5.3 Spindelcheckpoint-Hemmung als molekulare Krebstherapie

In der molekularen Krebstherapie gibt es bereits eine Vielzahl von Substanzen, die spezifisch das Wachstum der Tumorzellen hemmen können und/oder zur Induktion von Apoptose führen. Gö6976 verfügt über einen Wirkmechanismus, der für die Krebstherapie nutzbar ist. Das bedeutet, dass eine Spindelcheckpoint-Hemmung sich in die Vielzahl der molekularen Therapieansätze einreihen kann.

Wirkung auf chemotherapieresistente Krebszellen

Therapeutisch könnte der Mechanismus der Spindelcheckpoint-Inaktivierung in folgender klinischer Situation ausgenutzt werden: zur Therapie spindelcheckpointdefekter Krebszellen. Neben der Entwicklung allgemeiner Chemotherapie-Resistenz, z.B. durch Defekte im Apoptose-Signalweg oder durch eine Überexpression von p-Glykoprotein (MDR1), können Krebszellen gegenüber spindelschädigenden Chemotherapeutika durch spezielle Mechanismen Resistenzen entwickeln. Zum einen kann die Synthese von verändertem Tubulin zu einem Therapieversagen von Taxol führen (Huhn 2001). Zum anderen ist gezeigt, dass ein funktionierender Spindelcheckpoint Voraussetzung für die Wirkung von Taxol ist (Vogel *et al.* 2007). Für die Funktion des Checkpoints wiederum sind normale Protein-Mengen von BubR1, Bub1, Mad1, Mad2 und anderen Proteinen notwendig (Sudo *et al.* 2004). Es konnte in einem isogenem HCT116-Zellsystem gezeigt werden, dass HCT-MAD1-kd- und HCT-MAD2+/-Zellen weniger sensitiv auf Nocodazol bzw. Taxol reagieren als der Wildtyp (Vogel 2008).

Inwiefern ist nun der Spindelcheckpoint Voraussetzung für den Erfolg einer Chemotherapie mit Spindel-Inhibitoren? Bevor die Apoptose als Antwort auf den Spindelschaden eingeleitet werden kann, verweilt die Zelle zunächst in einem

verlängerten mitotischen Arrest und tritt nachfolgend aus der Mitose aus (Sudo *et al.* 2004, Vogel *et al.* 2007). Der Austritt aus der Mitose ist vermutlich durch einen langsamen Abbau von Cyclin B vermittelt (Brito und Rieder 2006). Ohne einen mitotischen Arrest kann die Apoptose nicht eingeleitet werden. Der genaue Mechanismus, wie es zur Einleitung der Apoptose kommt, ist allerdings noch unklar.

Gö6976 ist als Einzelsubstanz in der Lage, Apoptose in Tumorzellen (z.B. HCT116-Zellen vom Wildtyp) auszulösen. Die Rate der Apoptose ist abhängig von der Gö6976-Konzentration (Stolz *et al.* 2009). Die Wirkung von Gö6976 beruht auf zwei Effekten. Zunächst werden mitotische Aufreihungsdefekte erzeugt, die zu einem transienten mitotischen Arrest führen. In einem zweiten Schritt induziert Gö6976 eine vorzeitige Inaktivierung des Spindelcheckpoints. Dies resultiert in einer massiven Chromosomenfehlverteilung und die Zelle geht in die Apoptose über.

Interessanterweise reagieren Zellen mit einem defekten Spindelcheckpoint (HCT-*MAD1*-kd und HCT-*MAD2*^{+/-}) sensitiver auf Gö6976. Das bedeutet, dass Gö6976 in der Lage ist, trotz des defekten Spindelcheckpoints Apoptose zu induzieren. Der Grund für die erhöhte Sensitivität beruht wahrscheinlich auf dem Doppeleffekt von Gö6976. Einerseits inhibiert Gö6976 den Spindelcheckpoint. In den bereits defekten Tumorzellen wird also die vorhandene Restfunktion des Spindelcheckpoints gehemmt. Zusätzlich induziert Gö6976 mitotische Defekte, z.B. Chromosomen-Aufreihungsdefekte.

Spezifische Wirkung von Gö6976 in der Mitose als Therapievorteil

Gö6976 wirkt spezifisch auf die Aurora-Kinasen. Aurora B ist ein Protein, das bisher nur im Zusammenhang mit dem Spindelcheckpoint-Signalweg bekannt ist. Dies hat den Vorteil, dass weniger Nebenwirkungen im Vergleich zu anderen antimitotisch wirksamen Substanzen, wie z.B. Taxol, zu erwarten sind. Taxol beeinträchtigt neben der Mikrotubulidynamik des Spindelapparats ebenfalls die Mikrotubuli in der Interphase. Als Nebenwirkung leiden die Patienten daher im Rahmen einer Chemotherapie mit Taxol unter einer Polyneuropathie.

Die Entwicklung und klinische Testung weiterer Aurora-Inhibitoren unterstreicht die Bedeutung der Spindelcheckpoint-Inaktivierung als Therapie-Konzept. VX-680 (vertex) ist ein Aurora-Inhibitor, der sich bereits in der klinischen Phase II in Anwendung bei kolorektalen Karzinomen und nichtkleinzelligen Bronchialkarzinomen befindet (Harrington *et al.* 2004).

Synergismus von Gö6976 und Taxol

Es konnte schließlich gezeigt werden, dass Gö6976 und Taxol synergistisch auf Tumorzellen wirken (Stolz *et al.* 2009). Dabei muss jedoch auf eine sequentielle Behandlung geachtet werden. Einen additiven Effekt kann man nur erzielen, wenn die Tumorzellen zunächst mit Taxol vorbehandelt werden und in der Mitose arretieren. Geht man in der umgekehrten Reihenfolge vor und behandelt die Zellen zuerst mit Gö6976 und dann mit Taxol, so wird kein ausreichend mitotischer Arrest erreicht.

In diesem Zusammenhang wäre es sinnvoll, auch spindelcheckpoint-defekte Tumorzellen auf einen synergistischen Effekt von Taxol und Gö6976 zu untersuchen.

Nachteile von Gö6976 in der Tumorthherapie

Wie bei vielen Chemotherapeutika ist auch bei Gö6976 die Entstehung von Zweitumoren nicht ausgeschlossen. Denn Gö6976 führt zu Chromosomen-Aufreihungsdefekten in der Mitose und kann so auch in gesunden Zellen zu einer chromosomalen Aberration führen.

Des Weiteren muss die Wirkung von Gö6976 im niedrigen Konzentrationsbereich diskutiert werden. Es ist gezeigt, dass Gö6976 in Abhängigkeit von der Konzentration Apoptose induziert (Stolz *et al.* 2009). Es ist jedoch vorstellbar, dass Gö6976 in sehr geringen Dosen das Wachstum bzw. die Entstehung von Tumoren begünstigen kann. Geringe Dosen könnten dazu führen, dass die Funktion des Spindelcheckpoints eingeschränkt, aber nicht in therapeutischem Sinn ausgeschaltet wird. Dies kann dann zur Resistenz von Tumoren mit ursprünglich funktionierendem Spindelcheckpoint gegenüber Spindel-Inhibitoren führen.

Weiterentwicklung von Gö6976

Um Gö6976 als spezifischen Inhibitor zu nutzen, müssen unerwünschte Wechselwirkungen mit anderen Strukturen ausgeschaltet werden. Dies gilt besonders für die Wirkung auf die Proteinkinase C. Zwar besteht die Hypothese, dass es für Gö6976 ein therapeutisches Fenster ohne PKC-Inhibition geben könnte (Kohn *et al.* 2003), jedoch würde ein Ausschluss dieser Wechselwirkung mit PKC die Sicherheit eines Medikaments deutlich erhöhen. Gö6976 sollte daher strukturell optimiert und an die Zielstruktur angepasst werden.

5.4 Fazit

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der Inhibitor Gö6976 eine wichtige Kontroll-einheit des Zellzyklus, den Spindelcheckpoint, in humanen Karzinom-Zelllinien inaktiviert (gezeigt in HeLa- und HCT116-Zellen). Die Inaktivierung erfolgt abhängig vom Proteasom. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse, z.B. die Delokalisation der Checkpoint-Kinasen vom Kinetochor darauf hin, dass die Inaktivierung des Spindelcheckpoint über eine Inhibition der Aurora-Kinasen A und B erfolgt. Dies konnte durch weitere Experimente bestätigt werden (Stolz *et al.* 2009).

Der Inhibitor Gö6976 ist in der Lage in Tumorzellen Apoptose zu induzieren. Zentral für die Bedeutung von Gö6976 im Rahmen einer Chemotherapie ist die Tatsache, dass Gö6976 in spindel-inhibitor-resistenten Tumorzellen Apoptose induzieren kann (Stolz *et al.* 2009). Aufgrund einer funktionellen Störung des Spindelcheckpoints können Tumorzellen Resistenzen z.B. gegenüber Taxol entwickeln. Gö6976 setzt die schon beeinträchtigte Funktionalität des Spindelcheckpoints noch weiter herab und so kommt es in den taxolresistenten Tumorzellen zur Einleitung der Apoptose. Zudem ist gezeigt, dass Gö6976 und Taxol synergistisch wirken (Stolz *et al.* 2009). Dies bedeutet, dass man taxolresistenten Tumorzellen mit dem Mechanismus der Spindelcheckpoint-Inhibition therapeutisch in Zukunft begegnen kann.

Im Vergleich zu Taxol hat die Inhibierung des Spindelcheckpoints durch Gö6976 den Vorteil, dass Proteinstrukturen inhibiert werden, die nur in der Mitose aktiv sind. Die Mikrotubuli dagegen, die durch Taxol inhibiert werden, spielen auch in Zellen der Interphase eine wichtige Rolle und daher ist eine Taxol-Therapie mit einem breiten Spektrum an Nebenwirkungen verbunden.

Einen Nachteil von Gö6976 könnte die *de novo*-Induktion von Tumoren darstellen. Einerseits induziert Gö6976 Chromosomen-Aufreihungsdefekte (Abb.11), andererseits konnte demonstriert werden, dass Gö6976 Aneuploidie induziert (Stolz *et al.* 2009).

Auch für die Grundlagenforschung ist die Charakterisierung eines spezifischen Spindelcheckpoint-Inhibitors von großem Interesse. Gö6976 stellt in diesem Zusammenhang ein wertvolles Instrument zur weiteren Aufklärung der Signalkaskade des Spindelcheckpoints dar.

6 Material und Methoden

6.1 Material

Geräte

Zentrifugen:

- Zentrifuge Typ Biofuge A (Fa. Heraeus, Hanau)
- Zentrifuge Typ Biofuge pico (Fa. Heraeus, Hanau)
- Zentrifuge Typ Biofuge fresco (Fa. Heraeus, Hanau)
- Multifuge 3L-R, kühlbar (Fa. Heraeus, Hanau)
- Kühlzentrifuge Type GP (Fa. Beckmann, München)
- Kühlzentrifuge Typ J2-21 M/E, Rotor JS 13-1 (Fa. Beckmann, München)

Inkubatoren:

- Zellkultur

- CO₂-begasbarer Brutschrank Typ Cytoperm, BBD 6220 (Fa. Heraeus, Hanau)

- Bakterienkultur

- Brutschrank, nicht begasbar, Typ B6120 (I) (Fa. Heraeus, Hanau)
- Schüttelinkubator Typ AJ112 (Fa. Infors AG, Bottmingen, Schweiz)

Heizblöcke:

- Thermostat 5320 (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Thermomixer comfort (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Heizblock Typ Dri-Block 08-3 (Fa. Techne, Dextford-Camebridge, England)

Netzgeräte:

- Power Pac 300 (Fa. Biorad, München)
- Power Supply Typ 100/200 (Fa. Biorad, München)
- Power Supply Typ PS 500x DC (Fa. Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
- Power Supply Typ 200/2.0 (Fa. Biorad, München)

Mikroskope:

- Leitz Axiovert 40 CFC Mikroskop (Leica Geosystems GmbH, München)
- CCD Kamera Hamamatsu, Typ C4742-95 (Hamamatsu, Japan)

Sonstige Geräte:

- Autoklav Modell 3850EL (Fa. Tuttnauer/ Paardeweide, Niederlande)
- FACS Calibur (Becton Dickinson, immunometry systems
San Jose, USA)
- Gelkammer SDS (Fa. Biorad, München)
Elektrophorese System Mini Protean 3
- Gelkammer Agarose (Fa. Biorad, München)
Elektrophorese System Wide Mini Sub Cell
- Mikrowelle AEG Micromat (Fa. AEG, Nürnberg)
- Milli-Q Water System (Fa. Millipore, Eschborn)
- pH-Meter 764-Multicalimatic (Fa. Knick, Egelsbach)
- Pipetten (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Röntgenfilmentwicklungsgerät (Kodak, New Haven, CT, USA)
X-OMAT 2000
- Semidry-Elektroblotter (Biorad, Hercules, CA, USA)
- Sonofizierer Branson (Branson, Danbury, CT, USA)
Sonic Power sonofier Modell S125
- Stickstofftank Typ Chronos Biosafe (Fa. Messer, Griesheim/ Düsseldorf)
- Vortex Heidolph Reax 2000 (Fa. Heidolph, Kelheim)
- Waage Modell und Feinwaage Modell H10T (Fa. Sartorius, Göttingen)
- Zellkultur Werkbank Laminair HA 2448 (Fa. Heraeus, Hanau)

Plastikgefäße:

- Eppendorf-Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Hamburg)
- Bakterienkulturen 100mm (Fa. Greiner, Nürtingen)
- Einfriereröhrchen 1ml (Fa. Nunc, Wiesbaden)
- 15ml, 50ml Falcons (Fa. Greiner, Nürtingen)
- 96-Well-Mikrotiter-Platte (Fa. Nunc, Wiesbaden)
- Zellkulturschalen 100mm und 140mm (Fa. Nunc, Wiesbaden and Fa. Greiner,
Nürtingen)
- FACS-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)

Sonstige Materialien:

- Deckgläser (Menzel, Braunschweig)
- Filterpapier (Whatman, Dassel)
- Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schüll, Dassel)
- Objektträger (Menzel, Braunschweig)
- Quarzküvette (Hellma, Mühlheim)
- Röntgenfilm (Fujifilm, Düsseldorf)

Chemikalien, Lösungen, Medien**Chemikalien**

Alle verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p.A. und wurden von folgenden Firmen bezogen: Merck (Darmstadt), Roche (Prenzlberg), Roth (Karlsruhe), Sigma Aldrich Chemie GmbH (Steinheim).

Inhibitoren und Zytostatika

Inhibitor/Zytostatika	Endkonzentration	Firma
ALLN	200µM	Alexis, Grünberg
Gö6976	2µM	Calbiochem, Schwalbach
Nocodazol	150nM	Sigma, Steinheim
Roscovotin	40µM	Calbiochem, Schwalbach
Taxol	100nM	Sigma, Steinheim
UCN-01	100nM	NCI (National Cancer Institute, Bethesda, USA)

Lösungen

- **H₂O**: Milli-Q gereinigt und autoklaviert
- **Acrylamid-Stocklösung** 30% Acrylamid/ 0,8% Bisacrylamid-Fertigmix (Fa. Roth, Karlsruhe)
- **APS** (Ammoniumpersulfat) 10% in H₂O
- **Boehringer-Lysepuffer**: 1% (w/v) Nonidet-P-40, 0,1% (w/v) Natrium-desoxcholat, 0,1 (w/v) SDS, 50mM Tris/ HCl pH 7,4, 150nM NaCl, 5mM

EDTA, 5mM EGTA, EDTA-freier Protease-Inhibitor Cocktail in Tablettenform (Roche, Penzberg) eingesetzt 1:25

- **Matsumoto-Puffer:** 1% (w/v) Nonidet-P-40, 50mM Hepes pH 7,4, 250 mM NaCl, 0,2mM EDTA, 5mM β -Glycerophosphat, 2mM Na_3VO_4 , 10mM NaF, 0,04% (v/v) EDTA-freier Protease-Inhibitor Cocktail in Tablettenform (Roche, Penzberg, 1 Tablette gelöst in 2ml), 500nM Microcystin, 1mM DTT
- **MBS:** 10mM MOPS, 150mM NaCl; pH 7,2
- **MBST:** 10mM MOPS, 150mM NaCl, 0,05% Tween-20; pH 7,2
- **PBS:** 6,5mM Na_2HPO_4 , 1,5mM KH_2PO_4 , 2,5mM KCl, 140mM NaCl, pH 7,25
- **PHEM:** 0,06M Pipes, 0,03M Hepes, 0,01M ETGA, 4,3mM MgSO_4 ; pH 7,0 (eingestellt mit KOH)
- **Trenngelpuffer:** 3M Tris, 0,8% (w/v) SDS, pH 8,8
- **Sammelgelpuffer:** 0,3M Tris, 0,2% (w/v) SDS, pH 6,8
- **SDS-Laufpuffer:** 52mM Tris, 53mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS, pH 8,6
- **SDS-Probenpuffer (5fach):** 14% (w/v) SDS, 15% (v/v) β -Mercaptoethanol, 50% (v/v) Glycerol, 0,25% (w/v) Bromphenolblau
- **TBS:** 50mM Tris/HCl, 160mM NaCl, pH 7,2,
- **TBST:** TBS mit 0,1% Tween 20; pH 7,2
- **Transferpuffer:** 0,1% (w/v) SDS, 25mM Tris/ HCl, 192mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, pH 8,3

Zellkulturmedien

- DMEM (PAA Laboratories GmbH, Pasching)
- RPMI 1640 (PAA Laboratories GmbH, Pasching)
- FCS [Fetal calf serum] (Gibco, Invitrogen, Paisley, UK)
- L-Glutamin (200mM), (Cambrex, Fa. Bio Whittaker, Verviers, Belgien)
- Penicillin (10000units/ml)/ Streptomycin (10000 $\mu\text{g/ml}$) (Cambrex, Fa. Bio Whittaker, Verviers, Belgium)

Den Medien DMEM und RPMI 1640 wurden 10% (v/v) FCS, sowie 1% Streptomycin und 1% Penicillin zugesetzt.

Bakterienkulturmedien

- LB-Medium: 1% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% NaCl; pH 7,5 (eingestellt durch NaOH)
- LB-Agarplatte: LB-Medium mit 1% Agar (w/v)
- Antibiotika: Ampicillin 100µM/ml

Säugerzelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Medium	Aufteilungsverhältnis beim Passagieren
	Zervixkarzinom (human)	DMEM	1:5
HCT116	Kolonkarzinom (human)	RPMI 1640	1:5

Antikörper

Antikörper	Firma	Konzentration	Verdünnung
primäre Antikörper			
monoklonaler Anti-β-Aktin-Antikörper (Maus-Aszites IgG ₁), Klon AC-15	Sigma, Saint Louis Missouri, USA	2,7 µg/µl	1:10.000 Wb
Anti-Bub1-Antikörper (BL 1680) Kaninchen IgG	Bethyl Laboratories, Inc. Montgomery, Texas, USA	1 µg/µl	1:1500 Wb
Anti-Bub1-Antikörper SB1.3 Schaf	Stephen Taylor, Manchester, UK (Johnson <i>et al.</i> 2004)	-	1:2000 Wb
Anti-BubR1-Antikörper (BL 1455) Kaninchen IgG	Bethyl Laboratories, Inc. Montgomery, Texas, USA	1 µg/µl	1:1500 Wb
Anti-BubR1-Antikörper SBR1 Schaf	Stephen Taylor, Manchester, UK (Johnson <i>et al.</i> 2004)	-	1:1500 Wb
Anti-CREST-Antikörper Humaner Autoantikörper	Europa Bioproducts, Wicken, Ely, Cambridge, UK	-	1:500 IF
Anti-Cyclin B ₁ -Antikörper (GNS1) sc245 Maus IgG ₁	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Kalifornien	0,2 µg/µl	1:1000 Wb
monoklonaler Anti-Phospho-Ser/Thr-Pro-MPM2-Antikörper Maus IgG ₁	Upstate, Lake Placid, New York, USA	1 µg/µl	1:1600 Facs

Antikörper	Firma	Konzentration	Verdünnung
primäre Antikörper			
TTK (C-19): sc 540 (human mps1) Kaninchen IgG	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, Kalifornien	0,2 µg/µl	1:1000 Wb
monoklonaler Anti-c-myc-Antikörper Klon 9E10 Maus	Sigma, Saint Louis Missouri, USA	3,3µg/µl	
monoklonaler Anti-Pds1-Antikörper (Klon DCS-280) (human securin) Maus IgG _{2a}	Labvision Corporation, Neomarkers (Dunn Labortechnik GmbH Asbach) Westinghouse CA, USA	0,2 µg/µl	1:1000 Wb
sekundäre Antikörper			
Alexa Fluor® 488 Anti-Maus- Antikörper Ziege IgG	Molecular Probes Eugene, OR, USA	2 µg/µl	1:2000 Facs
Peroxidase konjugierter Anti-Maus- Antikörper Ziege	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Dianova, Hamburg, Deutschland	0,8 µg/µl	1:4000 Wb
Peroxidase konjugierter Anti-Schaf-Antikörper Kaninchen	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Dianova, Hamburg, Deutschland	-	1:4000 Wb
Anti-Kaninchen HRP konjugierter Antikörper Ziege	PierceBiotechnology, Inc. Rockford, IL USA	0.01 µg/µl	1:400

Die primären Antikörper wurden mit TBS + 5% BSA verdünnt, während die sekundären Antikörper mit TBS + 2% Milchpulver verdünnt wurden.

6.2 Methoden

Zellkultur

Passagieren, Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die oben angeführten Zelllinien wurden routinemäßig in 10cm Zellkulturschalen in den angegebenen Medien kultiviert. In den Inkubatoren herrschte eine Luftfeuchtigkeit von 90%, die Temperatur wurde konstant bei 37°C gehalten und der CO₂ Anteil betrug 5%. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen passagiert. Zum Passagieren wurden die Zellen mit PBS gewaschen und dann mit 1ml Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Bei den HeLa-Zellen erfolgte zusätzlich eine Inkubation bei 37°C für 5min. Die abgelösten

Zellen wurden in 5ml PBS resuspendiert und in ein 15ml PP Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 1000rpm für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in Medium resuspendiert und entsprechend dem Passagierverhältnis in 5ml Medium resuspendiert und auf 5 neue Zellkulturschalen aufgeteilt, in die jeweils 9ml Medium bereits vorgelegt worden war.

Um die Zellen langfristig zu lagern, wurden die abgelösten Zellen abzentrifugiert und das Pellet einer konfluenten 10cm-Schale in 500µl Einfriermedium (Medium + 10% DMSO + 20% FCS) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1ml-Einfrier Röhrchen überführt und in zwei Schritten eingefroren. Zunächst über Nacht bei -80°C und dann wurden die gefrorenen Aliquots zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff gebracht. Das Auftauen hingegen erfolgte schnell in einem Schritt bei 37°C. Die Zellen wurden nach dem Auftauen in eine 10cm-Kulturschale mit frischem Medium überführt. Das Medium wurde gewechselt, sobald sich die Zellen gesetzt hatten, und weiter kultiviert.

Chromosomen-Spreitungs-Analyse

Das Chromosomen-Spreiten dient zur Darstellung der Chromosomen in der Metaphase. Die Zellen wurden zunächst für 2-6h mit Nocodazol (150nM) behandelt, um sie in der Mitose zu arretieren. Dann wurden die Zellen mit Trypsin geerntet und 5min bei 1000rpm abzentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 2ml vorgewärmten, hypotonen Medium (40% RPMI-Medium, ohne Penicillin, Streptomycin und FCS, 60% destilliertes Wasser) vorsichtig resuspendiert und anschließend für 10min bei 37°C inkubiert. Eine schonende Fixierung wurde durch eine schrittweise Zugabe von Carnoy's fixative (Methanol: Eisessig (100%) 3:1 (v/v), Aufbewahrung bei -20°C) erzielt. Es wurde 1ml Carnoy's Fixativ dazugegeben und die Suspension durch Pippetieren gemischt. Dann wurden die Zellen 3min auf Eis fixiert. Dieser Fixierungsschritt wurde zweimal wiederholt. Es folgte erneut eine Zentrifugation von 5 min bei 1000rpm, der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde das Zellpellet in 1ml Carnoy's Fixativ resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen 5min bei 1000rpm abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde dreimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 1ml 100%iger Essigsäure resuspendiert. Von dieser Lösung wurden 50µl aus großer Entfernung auf einen gekühlten, nassen Objektträger aufgetropft. Die Objektträger wurden zum Trocknen für eine Minute auf

einen Heizblock aufgelegt. Danach wurde der Objektträger bei Raumtemperatur vollständig getrocknet. Die restliche Zellsuspension wurde abzentrifugiert und das Pellet in Carnoy's Fixativ resuspendiert. Diese Lösung wurde bei -20°C aufbewahrt.

Giemsa-Färbung: Die Giemsa-Lösung zur Färbung der Chromosomen wurde frisch angesetzt. (8% Giemsafärbelösung in PBS, Sigma, München). Die getrockneten Objektträger wurden für 5-10min in die Färbelösung gestellt, danach kurz in destilliertes Wasser getaucht und bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurden die Zellen mit Euparal-Medium (40µl, Merck) eingebettet. Die Deckgläschen wurden an den Rändern mit Nagellack abgedichtet.

FACS-Analyse

Mit der FACS-Analyse wurde zum einen der DNA-Gehalt der Zellen und zum anderen der mitotische Index anhand des MPM2-Signals gemessen. Die Zellen für die FACS-Analyse wurden mit Trypsin-EDTA-Lösung geerntet, der Überstand wurde mitgeerntet. Nach dem Zentrifugieren bei 2500rpm für 5min wurden die Zellen mit PBS gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 500µl PBS resuspendiert und unter Vortexen bei geringer Stufe wurden 2ml eiskaltes 70% Ethanol tropfenweise zugefügt. Die Fixierung erfolgte bei 4°C für mindestens 12h.

Zur Erstellung eines DNA-Profiles wurden die fixierten Proben bei 2500rpm über 5min abzentrifugiert und das Pellet in PBS (6,5mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 2,5mM KCl, 140mM NaCl, pH 7,25) mit RNase (1mg/ml) resuspendiert und über Nacht bei 4°C verdaut. Nach Zugabe von Propidiumiodid (50µg/ml) wurde die Probe mit dem FACS-Gerät (FACSCalibur, BectonDickinson, San Jose, CA, USA) gemessen.

Für eine MPM2-FACS-Analyse wurden die Zellen mit dem Anti-MPM2-Antikörper gefärbt. Die fixierten Zellen wurden bei 2500rpm für 5min abzentrifugiert, in 1ml Waschlösung (PBS + 0,05% Triton-X-100) resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und erneut für 5min bei 4000rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in Färbelösung (PBS + 1% FCS + 0,2% Triton-X-100 + Anti-Phospho-Ser/Thr-Pro-MPM2-Antikörper 1:1600 (Upstate, Lake Placid, New York, USA)) resuspendiert und für 2h Stunden auf Eis inkubiert. Der überschüssige Antikörper wurde im Anschluss durch zweimaliges Waschen entfernt. Der Alexa Fluor® 488 gekoppelter Anti-Maus-Antikörper (Molecular Probes Eugene, OR, USA) wurde 1:2000 in der Färbelösung (PBS + 1% FCS + 0,2% Triton-X-100) verdünnt und die Zellen wurden darin resuspendiert. Die Inkubationszeit betrug 2h auf Eis und

anschließend wurden die Zellen noch einmal mit 1ml Waschlösung und anschließend mit 1ml PBS für jeweils 5min gewaschen und jeweils 5min bei 4000rpm zentrifugiert. Zuletzt wurden die Zellen ebenfalls mit RNAase verdaut und mit Propidiumiodid gefärbt, wie bereits oben beschrieben.

Herstellung von Zelllysaten

Um die Proteinexpression durch SDS-Gelelektrophorese zu untersuchen, wurden zunächst aus dem Zellmaterial Lysate hergestellt. Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA (1ml pro 10cm-Schale) geerntet. Das bedeckende Medium wurde ebenfalls mitgeerntet. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 1000rpm für 5min pelletiert. Nach einem Waschschrift mit 5ml PBS wurde das Pellet in Boehringer-Lysepuffer (1% (w/v) Nonidet-P-40, 0,1% (w/v) Natrium-desoxcholat, 0,1 (w/v) SDS, 50mM Tris/ HCl pH 7,4, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 5mM EGTA, EDTA-freier Protease-Inhibitor Cocktail in Tablettenform (Roche, Penzberg) eingesetzt 1:25) resuspendiert und 10min auf Eis inkubiert. Für das Zellmaterial einer konfluenten 10cm-Schale wurden 500µl Boehringer-Lysepuffer eingesetzt. Nach der Inkubation auf Eis wurden die Lysate bei 13000rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lysate wurden zur Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Lysate zur Detektion von phosphorylierten Proteinen wurden mit Matsumoto-Puffer (1% (w/v) Nonidet-P-40, 50mM Hepes pH 7,4, 250 mM NaCl, 0,2mM EDTA, 5mM β -Glycerophosphat, 2mM Na_3VO_4 , 10mM NaF, 0,04% (v/v) EDTA-freier Protease-Inhibitor Cocktail in Tablettenform (Roche, Penzberg, 1 Tablette gelöst in 2ml), 500nM Microcystin, 1mM DTT) und anschließender Ultraschallbehandlung hergestellt (3x2 Ultraschall-Impulse in der Einstellung 2 des Sonifiziers). Während der Ultraschall-Behandlung wurden die Proben auf Eis gelagert.

Quantifizierung von Proteinen (Lowry *et al.* 1951)

Die Proteinkonzentrationen von Zelllysaten wurden photometrisch bestimmt. Hierzu wurde ein modifizierter Lowry Assay verwendet (Biorad D_c Protein Assay, Fa. Biorad, Krefeld). Dieser Assay ist unabhängig von Detergenzien und wird somit nicht von der Zusammensetzung des Lysepuffers beeinflusst. Der Assay wurde nach Angabe des Herstellers durchgeführt. Als Standard wurde eine Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung verwendet (0, 2, 4, 6, 8, 10µg/µl). Die Messung erfolgte in einer 96-well-Platte

bei einer Wellenlänge von 750nm. Die Konzentrationen konnten anhand der gemessenen Extinktionen und der Standardwerte bestimmt werden.

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970)

Zur Auftrennung von Proteingemischen wurde das diskontinuierliche Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern verwendet. SDS (Sodiumdodecylsulfat) bindet und denaturiert die Proteine, sodass negativ geladene Proteinkomplexe entstehen, die entsprechend ihrem Molekulargewicht in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Zur Herstellung eines Gels wurde das Sammelgel mit einem Trenngel überschichtet. Für eine 9%ige Trenngellösung wurden 14,4ml Acrylamidlösung „Rotiphorese Gel 30“ (Fa. Roth, Karlsruhe), 6ml Trenngelpuffer (3M Tris, 0,8% (w/v) SDS, pH 8,8) und 27,6ml H₂O gemischt. Zur Polymerisation von 14ml der Trenngellösung (ausreichend für ein großes Gel) wurden 135µl 10%iges APS und 4µl TEMED hinzugegeben. Nach kurzem Schwenken wurde die Lösung zwischen zwei Glasplatten, die zuvor mit Ethanol gereinigt wurden, gegossen.

Für die Trenngellösung wurden 8ml Acrylamidlösung „Rotiphorese Gel 30“ (Fa. Roth, Karlsruhe), 24ml Sammelgelpuffer (0,3M Tris, 0,2% (w/v) SDS, pH 6,8) und 16ml H₂O gemischt. Zur Polymerisation wurden 60µl APS und 5µl TEMED dazugegeben. In das Sammelgel wurde ein Gelkamm gesteckt.

Probenaufbereitung

Die Proteinlysate wurden auf Eis aufgetaut und jeweils eine Lysatmenge von 60µg mit 5x SDS-Probenpuffer (14% (w/v) SDS, 15% (v/v) β-Mercaptoethanol, 50% (v/v) Glycerol, 0,25% (w/v) Bromphenol-blau) versetzt. Danach wurden die Proben auf einem Heizblock 5min auf 95°C erhitzt und anschließend zentrifugiert (2min, 13000rpm). Dann wurden die Geltaschen mit Lysat beladen. Zu Beginn erfolgte die Gelelektrophorese mit einer Spannung von 50V, später wurde die Spannung auf 100V erhöht.

Western-Blotting (Kyhse-Andersen 1984) (Towbin *et al.* 1979)

Beim Blotten werden die Proteine des SDS-Gels elektrophoretisch auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Das Blotten wurde semi-trocken durchgeführt, dabei wurde folgender Transfer-Puffer verwendet: 25mM Tris, 192mM Glycin, 0,1% SDS (w/v), 20% Methanol (v/v). Zunächst wurden Nitrozellulose-Membran und Filter-

papier im Blot-Puffer äquilibriert. Der Blot wurde in folgender Schichtung in dem Semidry-Elektroblotter (Biorad, Hercules, CA, USA) luftblasenfrei aufgebaut:

Anode
2 Lagen Whatman-Papier
Nitrocellulose-Membran
SDS-Gel
2 Lagen Whatman-Papier
Kathode

Die Transferzeit betrug 90min bei einer konstanten Stromstärke von 45mA (~0,7mA/cm²). Um die Transfereffizienz zu kontrollieren, wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau-S-Lösung (0.2% Ponceau S in 3% Essigsäure) rot angefärbt und im Anschluss mit H₂O wieder entfärbt. Dann wurde die Membran 60min bei Raumtemperatur mit einer Blocklösung (TBS (50mM Tris/HCl, 160mM NaCl, pH 7,2) + 5% Milchpulver) inkubiert, um die unspezifischen Bindungen abzusättigen. Nach drei kurzen Waschschritten, jeweils 5min, mit TBST (TBS + 0,1% Tween-20) folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C. Der überschüssige Antikörper wurde nach 12h entfernt und die Membran dreimal für jeweils 5min mit TBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte bei Raumtemperatur über 2h.

Herstellung superkompetenter *Escherichia coli* DH5a (Inoue *et al.* 1990)

Zur Herstellung superkompetenter *E.coli* wurden 10ml einer Vorkultur in LB-Medium (% (w/v) Bacto-Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% NaCl; pH 7,5 (eingestellt durch NaOH)) auf 250ml mit SOB-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10mM MgSO₄, 10mM NaCl, 10mM MgCl₂) aufgefüllt. Dann wurden die Bakterien bei einer Temperatur von 25°C in einem Bakterienschüttler (Fa. Heraeus, Hanau) inkubiert. Nach dem Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600nm}) von 0,5 wurden die Bakterien für 10min auf Eis gelagert und danach bei 3000rpm und einer Temperatur von 4°C für 15min zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 20ml eiskaltem TB-Puffer (55mM MnCl₂, 250mM KCl, 10mM PIPES / KOH pH 7.0, 15mM CaCl₂) resuspendiert, wiederum 10min auf Eis inkubiert und unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Es erfolgte eine Resuspendierung in 40ml TB-Puffer versetzt mit 7,5% DMSO. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurden die Bakterien aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schock gefroren. Gelagert wurden die Bakterien bei -80°C.

Transformation von *Escherichia coli* DH5a (modifiziert nach (Hanahan 1983))

Die superkompetenten *E.coli* wurden durch ein Hitzeschockverfahren transformiert. Ein Aliquot von Bakterien wurde zunächst auf Eis aufgetaut und dann wurden 100µl der Bakterienlösung mit 1µl Plasmid-DNA-Lösung (1µg/µl Plasmid-DNA) versetzt. Um einen Hitzeschock zu erzeugen, wurden die Bakterien für 90s auf einen 42°C warmen Heizblock gestellt, danach wurde 1ml LB-Medium ohne Antibiotika zugegeben. Nun wurden die Bakterien 60min in einem Schüttelinkubator bei 37°C inkubiert und anschließend 10sec bei 13000rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde dann in 100µl LB-Medium resuspendiert und auf Antibiotika-haltigen LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert.

Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Um Plasmid-DNA von hohem Reinheitsgrad für die Verwendung von Transfektionen zu erhalten, wurden Maxi- und Midi-Präparationen durchgeführt. Hierzu wurde ein Nukleobond Kit (Fa. Nukleobond, Düren) verwendet. Die Durchführung erfolgte mit den Lösungen des Kits nach Angaben des Herstellers. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in sterilem H₂O gelöst und die Konzentration photometrisch bestimmt.

Transfektion von Säugerzelllinien (Baum *et al.* 1994)

Transiente Transfektionen wurden durch eine Elektroporation der Zellmembran herbeigeführt. Die tags zuvor ausgesäten HCT116-Zellen (Passagieverhältnis 1:2) wurden mit Trypsin geernetet und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in RPMI 1640-Medium aufgenommen, dabei wurde die Zellzahl auf 4 Mio Zellen/ml eingestellt. 400µl (1,6 x 10⁶ Zellen) dieser Suspension wurden zusammen mit der Plasmid-DNA in eine Elektroporationsküvette mit einem Durchmesser von 4mm gegeben. Die Elektroporation erfolgte bei 300V und 960µF mit dem Gene Pulser (Biorad, München). Nach der Elektroporation wurde der Inhalt einer Küvette in eine 10cm-Kulturschale mit 10ml RPMI 1640-Medium gegeben. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die toten Zellen zu entfernen. Nach 48-72h wurden die Zellen geernetet.

Immunfluoreszenz-Analysen

Die Zellen für Immunfluoreszenz-Analysen wurden auf polylysinierte Deckgläschen ausgesät. Dazu wurde 0.3% Poly-L-Lysin (Sigma) für 10min auf die Deckgläschen auf-

gebracht und anschließend fünfmal mit PBS (6,5mM Na₂HPO₄, 1,5mM KH₂PO₄, 2,5mM KCl, 140mM NaCl, pH 7,25) gewaschen.

Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 1% Paraformaldehyd (PFA) in PHEM (0,06M Pipes, 0,03M Hepes, 0,01M ETGA, 4,3mM MgSO₄; pH 7,0 (eingestellt mit KOH)) für 15min bei Raumtemperatur fixiert. Zur Herstellung einer PFA-Lösung wurden 0,8g PFA in 10ml Wasser unter dem Abzug in einem Wasserbad vorsichtig auf 80°C erhitzt. Dann wurden einige Tropfen einer 1M NaOH-Lösung und 10ml einer 2x PHEM-Lösung hinzugegeben. Abschließend wurde die Lösung mit Hilfe eines 0,2µm Sterilfilters filtriert. Nach einem Waschschrift mit MBST (10mM MOPS, 150mM NaCl, 0,05% Tween-20; pH 7,2) wurden die Zellmembranen nach einer schonenden Methode mit 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]-propansulfat (1% CHAPS in PHEM für 10 min bei Raumtemperatur) permeabilisiert. Dann wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 20% Ziegenerum (Rockland, Gilbertsville, USA) geblockt. Dazu wurde das Deckgläschen für 60min auf einen Parafilmstreifen mit einem Serumtropfen gelegt. Die Zellen wurden mit MBST gewaschen und dann mit dem Primärantikörper in MBS + 5% Ziegenerum für 2h inkubiert. Der Sekundärantikörper wurde anschließend nach drei Waschschriften jeweils 5min mit MBST dazugegeben, ebenfalls in MBST + 5% Ziegenerum verdünnt. Zum Abschluss wurden die Zellen zweimal mit MBST, einmal mit MBS gewaschen und in Vectashield-Medium (Vector Laboratories) eingebettet. Der Rand der Deckgläschen wurde mit Nagellack versiegelt. Die DNA wurde durch eine fünfminütige Inkubation mit Höchst 33258 (Fluka Biochemika, 1:15000 in MBS) angefärbt. Danach wurde dreimal mit MBST, einmal mit MBS gewaschen. Die Präparate wurden bei -20°C gelagert.

Immunopräzipitation

Die Zellen wurden mit Trypsin/EDTA (1ml pro 10cm-Schale) bzw. durch einen „Shake-off“ zur Analyse der mitotischen Zellpopulation geerntet. Das bedeutet, dass die Schale leicht gegen die Tischkante geschlagen wurde und es durch die Erschütterung zu einer Ablösung der mitotischen Zellen kam. Nach Zentrifugation bei 1000rpm für 5min wurden die Zellen mit 5ml PBS gewaschen und das Pellet nach erneuter Zentrifugation in NP40-Puffer (0,7% (v/v) Nonidet-P-40, 20mM Hepes pH 7,4, 175mM NaCl, 10mM EDTA, 0,04% (v/v) Protease Inhibitor Cocktail (Roche, Penzberg), 0,5 mM Na₃VO₄ und 0,5µM Microcystin) resuspendiert. Zur Freisetzung der Proteine und zur Scherung der DNA wurde eine Beschallung der Proben durchgeführt. Es erfolgten 3x2

Ultraschall-Impulse in der Einstellung 2 des Ultraschallgenerators (Sonifizierer Branson Sonic Power sonofier Modell S125 (Branson, Danbury, CT, USA)). Hieran anschließend wurde eine Zentrifugation bei 13000rpm für 20min bei 4°C durchgeführt. Das Lysat wurde dann in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und eine Bestimmung des Proteingehalts durchgeführt.

Pro Immunopräzipitation wurden 600µg Protein-Lysat in einer Konzentration von 3µg/µl eingesetzt und mit 2 µl Anti-myc-Antikörper 9E10 (Sigma), 4µl Anti-Bub1-Antikörper (Zur Verfügung gestellt von S. Taylor, Manchester, England), 4 µl Anti-BubR1-Antikörper (Zur Verfügung gestellt von S. Taylor, Manchester, England) oder 4-6µl Anti-BubR1-Antikörper (Bethyl Laboratories) bei 4°C rotierend für 180min inkubiert. Danach wurden 10µl Protein-G-Sepharose äquilibriert in NP40-Puffer (0.7% (v/v) Nonidet-P-40, 20mM Hepes pH 7.4, 175mM NaCl, 10mM EDTA, 0.04% (v/v)) hinzugeben und erneut für 90min rotierend bei 4°C inkubiert. Die Immunkomplexe wurden anschließend bei 2000rpm bei 4°C für 2min abzentrifugiert, gefolgt von drei Waschschritten mit jeweils 400µl NP40-Puffer. Abschließend wurde die Sepharose-Matrix beladen mit den Immunkomplexen auf drei Reaktionsgefäße aufgeteilt. Eine Probe wurde mit 20µl heißem SDS-Probenpuffer versetzt und für 5min auf 95°C erhitzt. Um den Erfolg der Immunpräzipitation zu kontrollieren, wurde diese Probe bei 2000rpm zentrifugiert und der Überstand einer SDS-Gelelektrophorese zugeführt. Die verbleibenden Proben wurden für einen Kinase-Assay eingesetzt.

Kinase-Assay

Die immunkomplexbeladene Protein-G-Sepharose (Santa Cruz, CA, USA) wurde zunächst zweimal mit Kinase-Puffer (50mM Tris/HCl pH 7,7, 100mM KCl, 10mM MgCl₂, 5mM MnCl₂, 1mM DTT) gewaschen. Im folgenden Schritt wurden die Immunkomplexe in ATP-haltigem Kinase-Puffer resuspendiert (Kinase-Puffer + 200µM ATP). Als Substrat wurde 7µg Histon H₁ oder 7µg MBP hinzugegeben. Gleichzeitig erfolgte der Zusatz von 1µl [³²P]γ-ATP (in Kooperation mit Anne Kienitz, AG Bastians). Die Reaktionszeit betrug 30min bei 30°C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von jeweils 20µl heißem SDS-Probenpuffer und Erhitzung auf 95°C für 5min abgestoppt. Die Proben wurden danach bei 2000rpm für 2min abzentrifugiert und 20µl der einzelnen Proben wurden auf ein 20%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen und eine Gelelektrophorese mit einer Spannung von 100V durchgeführt. Nach 80min wurde die Elektrophorese gestoppt. Zur Trocknung wurde das Gel auf Whatman-Papier gelegt

und für 1h in einen Vakuum-Trockner transferiert (Model 583 Gel Dryer (BioRad, Hercules, CA, USA). Das radioaktive Signal wurde mittels eines Phospho-Imagers (Fujifilm FLA-3000, Fujifilm, Düsseldorf) detektiert (Expositionszeit: 60min).

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ALLN	Cappain Inhibitor I (N-Acetyl-Leu-Leu-Nle-CHO)
AMD	altersbedingte Makuladegeneration
APC/C	Anaphase Promoting Complex/ Cyclosom
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bub1	Budding uninhibited by benzimidazole 1
BubR1	Bub1 related protein
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CAK	-aktivierende Kinase
Cdc20	Cell division cycle 20
CDK	Cyclin Dependend Kinase
CENP-E	Centromeric Protein E
CIN	chromosomale Instabilität
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
<i>et al.</i>	et alteri
etc.	et cetera
F	Farad
FACS	Fluoreszenz-basierte Durchflusszytometrie
FCS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
Ggf.	Gegebenenfalls
h	Stunde
IC50	Konzentration bei der 50% der maximalen Inhibierung erreicht wird
INCENP	Inner Centromere Protein
Kap.	Kapitel
LB	Luria-Bertani-Medium
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
M	molar
Mad1	Mitotic-arrest deficient 1
Mad2	Mitotic-arrest deficient 2
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MCC	Mitotic Checkpoint Complex
min	Minuten
mM	millimolar
Mps1	Monopolar spindle 1
NHL	Non-Hodgkin-Lymphom
nM	nanomolar
NOC	Nocodazol

PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PKC	Proteinkinase C
Plk1	Polo-like kinase 1
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	messenger-RNA
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institut 1640
RV	Roscovitin
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA
TNM	T = Tumor, N = Lymphknoten, M = Fernmetastasen
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u.a.	unter anderem
Ub	Ubiquitin
V	Volt
WHO	World Health Organisation
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

8 Literaturverzeichnis

Abrieu A, Magnaghi-Jaulin L, Kahana JA, Peter M, Castro A, Vigneron S, Lorca T, Cleveland DW und Labbe JC (2001): Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell*, 106 (1) 83-93.

Adams RR, Carmena M und Earnshaw WC (2001): Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol*, 11 (2) 49-54.

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K, Forth W (2006), 9., völlig überarb. Aufl., [Nachdr.], Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Elsevier, Urban und Fischer, München [u.a.].

Alberts B, Jaenicke L (2004), 4. Auflage, Molekularbiologie der Zelle, Wiley-VCH, Weinheim.

Arkin MR und Wells JA (2004): Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov*, 3 (4) 301-17.

Bastians H, Topper LM, Gorbsky GL und Ruderman JV (1999): Cell cycle-regulated proteolysis of mitotic target proteins. *Mol Biol Cell*, 10 (11) 3927-41.

Basu J, Bousbaa H, Logarinho E, Li Z, Williams BC, Lopes C, Sunkel CE und Goldberg ML (1999): Mutations in the essential spindle checkpoint gene bub1 cause chromosome missegregation and fail to block apoptosis in *Drosophila*. *J Cell Biol*, 146 (1) 13-28.

Baum C, Forster P, Hegewisch-Becker S und Harbers K (1994): An optimized electroporation protocol applicable to a wide range of cell lines. *Biotechniques*, 17 (6) 1058-62.

Biggins S und Murray AW (2001): The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev*, 15 (23) 3118-29.

Bohers E, Sarafan-Vasseur N, Drouet A, Paresy M, Latouche J, Flaman J, Sesboue R und Frebourg T (2008): Gradual reduction of BUBR1 protein levels results in premature sister-chromatid separation then in aneuploidy. *Hum Genet*, 124 (5) 473-8.

Brito DA und Rieder CL (2006): Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. *Curr Biol*, 16 (12) 1194-200.

Buffin E, Emre D und Karess RE (2007): Flies without a spindle checkpoint. *Nat Cell Biol*, 9 (5) 565-72.

Bumcrot D, Manoharan M, Kotliansky V und Sah DWY (2006): RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol*, 2 (12) 711-9.

Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW und Vogelstein B (1998): Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*, 392 (6673) 300-3.

Cassimeris L (1993): Regulation of microtubule dynamic instability. *Cell Motil Cytoskeleton*, 26 (4) 275-81.

Chan GK, Jablonski SA, Sudakin V, Hittle JC und Yen TJ (1999): Human BUBR1 is a mitotic checkpoint kinase that monitors CENP-E functions at kinetochores and binds the cyclosome/APC. *J Cell Biol*, 146 (5) 941-54.

Chen R (2004): Phosphorylation and activation of Bub1 on unattached chromosomes facilitate the spindle checkpoint. *EMBO J*, 23 (15) 3113-21.

Chung E und Chen R (2002): Spindle checkpoint requires Mad1-bound and Mad1-free Mad2. *Mol Biol Cell*, 13 (5) 1501-11.

Chung E und Chen R (2003): Phosphorylation of Cdc20 is required for its inhibition by the spindle checkpoint. *Nat Cell Biol*, 5 (8) 748-53.

De Antoni A, Pearson CG, Cimini D, Canman JC, Sala V, Nezi L, Mapelli M, Sironi L, Faretta M, Salmon ED und Musacchio A (2005): The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Curr Biol*, 15 (3) 214-25.

Diefenbach A (2003): Chemische Kampfstoffe, aufgerufen am: 02.01.2008. http://www.staff.uni-marburg.de/~gvw/texte.mix/chemie_kampfstoffe.html

Ditchfield C, Johnson VL, Tighe A, Ellston R, Haworth C, Johnson T, Mortlock A, Keen N und Taylor SS (2003): Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *J Cell Biol*, 161 (2) 267-80.

Dobles M, Liberal V, Scott ML, Benezra R und Sorger PK (2000): Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. *Cell*, 101 (6) 635-45.

Doree M und Hunt T (2002): From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? *J Cell Sci*, 115 (Pt 12) 2461-4.

Dorer RK, Zhong S, Tallarico JA, Wong WH, Mitchison TJ und Murray AW (2005): A small-molecule inhibitor of Mps1 blocks the spindle-checkpoint response to a lack of tension on mitotic chromosomes. *Curr Biol*, 15 (11) 1070-6.

Draviam VM, Stegmeier F, Nalepa G, Sowa ME, Chen J, Liang A, Hannon GJ, Sorger PK, Harper JW und Elledge SJ (2007): A functional genomic screen identifies a role for TAO1 kinase in spindle-checkpoint signalling. *Nat Cell Biol*, 9 (5) 556-64.

Fu J, Bian M, Jiang Q und Zhang C (2007): Roles of Aurora kinases in mitosis and tumorigenesis. *Mol Cancer Res*, 5 (1) 1-10.

Fuse E, Tanii H, Kurata N, Kobayashi H, Shimada Y, Tamura T, Sasaki Y, Tanigawara Y, Lush RD, Headlee D, Figg WD, Arbuck SG, Senderowicz AM, Sausville EA, Akinaga S, Kuwabara T und Kobayashi S (1998): Unpredicted clinical pharmacology of UCN-01 caused by specific binding to human alpha1-acid glycoprotein. *Cancer Res*, 58 (15) 3248-53.

Golan A, Yudkovsky Y und Hershko A (2002): The cyclin-ubiquitin ligase activity of cyclosome/APC is jointly activated by protein kinases Cdk1-cyclin B and Plk. *J Biol Chem*, 277 (18) 15552-7.

Graves PR, Yu L, Schwarz JK, Gales J, Sausville EA, O'Connor PM und Piwnica-Worms H (2000): The Chk1 protein kinase and the Cdc25C regulatory pathways are targets of the anticancer agent UCN-01. *J Biol Chem*, 275 (8) 5600-5.

Grehn F (2006), 29., überarbeitete und aktualisierte Auflage, Augenheilkunde, Springer Medizin Verlag Heidelberg, Berlin, Heidelberg.

Grimm D und Kay MA (2007): Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? *J Clin Invest*, 117 (12) 3633-41.

Hanahan D (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166 (4) 557-80.

Hanahan D und Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 (1) 57-70.

Hardwick KG, Weiss E, Luca FC, Winey M und Murray AW (1996): Activation of the budding yeast spindle assembly checkpoint without mitotic spindle disruption. *Science*, 273 (5277) 953-6.

Harrington EA, Bebbington D, Moore J, Rasmussen RK, Ajose-Adeogun AO, Nakayama T, Graham JA, Demur C, Hercend T, Diu-Hercend A, Su M, Golec JMC und Miller KM (2004): VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo. *Nat Med*, 10 (3) 262-7.

Hartwell L (1992): Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell*, 71 (4) 543-6.

Hoyt MA, Totis L und Roberts BT (1991): *S. cerevisiae* genes required for cell cycle arrest in response to loss of microtubule function. *Cell*, 66 (3) 507-17.

Huhn (2001), 4., neubearb. und erw. Auflage, Medikamentöse Therapie maligner Erkrankungen, Urban und Fischer, München [u.a.].

Inoue H, Nojima H und Okayama H (1990): High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 96 (1) 23-8.

Iwanaga Y, Chi Y, Miyazato A, Sheleg S, Haller K, Peloponese JJ, Li Y, Ward JM, Benezra R und Jeang K (2007), Heterozygous deletion of mitotic arrest-deficient protein 1 (MAD1) increases the incidence of tumors in mice.

Jelluma N, Brenkman AB, van den Broek NJF, Crujisen CWA, van Osch MHJ, Lens SMA, Medema RH und Kops GJPL (2008): Mps1 phosphorylates Borealin to control Aurora B activity and chromosome alignment. *Cell*, 132 (2) 233-46.

Jin DY, Spencer F und Jeang KT (1998): Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell*, 93 (1) 81-91.

Johnson VL, Scott MIF, Holt SV, Hussein D und Taylor SS (2004), Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression.

Jordan MA, Wendell K, Gardiner S, Derry WB, Copp H und Wilson L (1996), Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death.

Jordan VC (2003): Tamoxifen: a most unlikely pioneering medicine. *Nat Rev Drug Discov*, 2 (3) 205-13.

Kaldis P (1999): The cdk-activating kinase (CAK): from yeast to mammals. *Cell Mol Life Sci*, 55 (2) 284-96.

Kalitsis P, Earle E, Fowler KJ und Choo KH (2000): Bub3 gene disruption in mice reveals essential mitotic spindle checkpoint function during early embryogenesis. *Genes Dev*, 14 (18) 2277-82.

Kang J, Chen Y, Zhao Y und Yu H (2007): Autophosphorylation-dependent activation of human Mps1 is required for the spindle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104 (51) 20232-7.

Kauffmann GW, Moser E, Sauer R, et al. (2006), 3., völlig überarb. Aufl, Radiologie, Elsevier, Urban und Fischer, München [u.a.].

Kienitz A, Vogel C, Morales I, Muller R und Bastians H (2005): Partial downregulation of MAD1 causes spindle checkpoint inactivation and aneuploidy, but does not confer resistance towards taxol. *Oncogene*, 24 (26) 4301-10.

Kohn EA, Yoo CJ und Eastman A (2003): The protein kinase C inhibitor Go6976 is a potent inhibitor of DNA damage-induced S and G2 cell cycle checkpoints. *Cancer Res*, 63 (1) 31-5.

Kops GJPL, Foltz DR und Cleveland DW (2004): Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 (23) 8699-704.

Kotani S, Tugendreich S, Fujii M, Jorgensen PM, Watanabe N, Hoog C, Hieter P und Todokoro K (1998): PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell*, 1 (3) 371-80.

Kyhse-Andersen J (1984): Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*, 10 (3-4) 203-9.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 (5259) 680-5.

- Lengauer C, Kinzler KW und Vogelstein B (1998): Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396 **(6712)** 643-9.
- Li R und Murray AW (1991): Feedback control of mitosis in budding yeast. *Cell*, 66 **(3)** 519-31.
- Logarinho E, Resende T, Torres C und Bousbaa H (2008): The human spindle assembly checkpoint protein Bub3 is required for the establishment of efficient kinetochore-microtubule attachments. *Mol Biol Cell*, 19 **(4)** 1798-813.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL und Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193 **(1)** 265-75.
- Mao Y, Abrieu A und Cleveland DW (2003): Activating and silencing the mitotic checkpoint through CENP-E-dependent activation/inactivation of BubR1. *Cell*, 114 **(1)** 87-98.
- Marcus R und Hagenbeek A (2007): The therapeutic use of rituximab in non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Haematol Suppl*, **(67)** 5-14.
- Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, Hug H, Marme D und Schachtele C (1993): Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem*, 268 **(13)** 9194-7.
- Matsumura S, Toyoshima F und Nishida E (2007): Polo-like kinase 1 facilitates chromosome alignment during prometaphase through BubR1. *J Biol Chem*, 282 **(20)** 15217-27.
- Meraldi P und Sorger PK (2005): A dual role for Bub1 in the spindle checkpoint and chromosome congression. *EMBO J*, 24 **(8)** 1621-33.
- Meraldi P, Draviam VM und Sorger PK (2004): Timing and checkpoints in the regulation of mitotic progression. *Dev Cell*, 7 **(1)** 45-60.
- Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, Kirchwegger R, Pasche B, Gerald W, Dobles M, Sorger PK, Murty VV und Benezra R (2001): MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature*, 409 **(6818)** 355-9.
- Minn AJ, Boise LH und Thompson CB (1996): Expression of Bcl-xL and loss of p53 can cooperate to overcome a cell cycle checkpoint induced by mitotic spindle damage. *Genes Dev*, 10 **(20)** 2621-31.
- Mocellin S, Costa R und Nitti D (2006): RNA interference: ready to silence cancer? *J Mol Med*, 84 **(1)** 4-15.
- Morrow CJ, Tighe A, Johnson VL, Scott MIF, Ditchfield C und Taylor SS (2005): Bub1 and aurora B cooperate to maintain BubR1-mediated inhibition of APC/CCdc20. *J Cell Sci*, 118 **(Pt 16)** 3639-52.
- Musacchio A und Hardwick KG (2002): The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3 **(10)** 731-41.
- Musacchio A und Salmon ED (2007): The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 **(5)** 379-93.
- Peters J (2006): The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7 **(9)** 644-56.
- Pinsky BA und Biggins S (2005): The spindle checkpoint: tension versus attachment. *Trends Cell Biol*, 15 **(9)** 486-93.
- Pinsky BA, Kung C, Shokat KM und Biggins S (2006): The Ipl1-Aurora protein kinase activates the spindle checkpoint by creating unattached kinetochores. *Nat Cell Biol*, 8 **(1)** 78-83.
- Rajagopalan H und Lengauer C (2004): Aneuploidy and cancer. *Nature*, 432 **(7015)** 338-41.

- Rana TM (2007): Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (1) 23-36.
- Rieder CL, Cole RW, Khodjakov A und Sluder G (1995): The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J Cell Biol*, 130 (4) 941-8.
- Sasai K, Parant JM, Brandt ME, Carter J, Adams HP, Stass SA, Killary AM, Katayama H und Sen S (2008): Targeted disruption of Aurora A causes abnormal mitotic spindle assembly, chromosome misalignment and embryonic lethality. *Oncogene*, 27 (29) 4122-7.
- Sausville EA, Arbuck SG, Messmann R, Headlee D, Bauer KS, Lush RM, Murgo A, Figg WD, Lahusen T, Jaken S, Jing X, Roberge M, Fuse E, Kuwabara T und Senderowicz AM (2001): Phase I trial of 72-hour continuous infusion UCN-01 in patients with refractory neoplasms. *J Clin Oncol*, 19 (8) 2319-33.
- Schliekelman M, Cowley DO, O'Quinn R, Oliver TG, Lu L, Salmon ED und Van Dyke T (2009): Impaired Bub1 function in vivo compromises tension-dependent checkpoint function leading to aneuploidy and tumorigenesis. *Cancer Res*, 69 (1) 45-54.
- Schmidt M und Bastians H (2007): Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resist Updat*, 10 (4-5) 162-81.
- Schmidt M, Budirahardja Y, Klompmaker R und Medema RH (2005): Ablation of the spindle assembly checkpoint by a compound targeting Mps1. *EMBO Rep*, 6 (9) 866-72.
- Senderowicz AM (2001): Development of cyclin-dependent kinase modulators as novel therapeutic approaches for hematological malignancies. *Leukemia*, 15 (1) 1-9.
- Senderowicz AM (2003): Small-molecule cyclin-dependent kinase modulators. *Oncogene*, 22 (42) 6609-20.
- Sherr CJ und Roberts JM (1999): CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev*, 13 (12) 1501-12.
- Skoufias DA, Indorato R, Lacroix F, Panopoulos A und Margolis RL (2007): Mitosis persists in the absence of Cdk1 activity when proteolysis or protein phosphatase activity is suppressed. *J Cell Biol*, 179 (4) 671-85.
- Stegmaier M, Hoffmann M, Baum A, Lenart P, Petronczki M, Krssak M, Gurtler U, Garin-Chesa P, Lieb S, Quant J, Grauert M, Adolf GR, Kraut N, Peters J und Rettig WJ (2007): BI 2536, a potent and selective inhibitor of polo-like kinase 1, inhibits tumor growth in vivo. *Curr Biol*, 17 (4) 316-22.
- Stolz A, Vogel C, Schneider V, Ertych N, Kienitz A, Yu H und Bastians H (2009): Pharmacologic abrogation of the mitotic spindle checkpoint by an indolocarbazole discovered by cellular screening efficiently kills cancer cells. *Cancer Res*; 69 (9).
- Strebhardt K und Ullrich A (2006): Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 6 (4) 321-30.
- Stucke VM, Sillje HHW, Arnaud L und Nigg EA (2002): Human Mps1 kinase is required for the spindle assembly checkpoint but not for centrosome duplication. *EMBO J*, 21 (7) 1723-32.
- Sudakin V, Chan GK und Yen TJ (2001): Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol*, 154 (5) 925-36.
- Sudo T, Nitta M, Saya H und Ueno NT (2004): Dependence of paclitaxel sensitivity on a functional spindle assembly checkpoint. *Cancer Res*, 64 (7) 2502-8.
- Sullivan M und Morgan DO (2007): Finishing mitosis, one step at a time. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8 (11) 894-903.
- Tanaka TU und Desai A (2008): Kinetochore-microtubule interactions: the means to the end. *Curr Opin Cell Biol*, 20 (1) 53-63.

- Tang Z, Shu H, Oncel D, Chen S und Yu H (2004): Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol Cell*, 16 (3) 387-97.
- Taylor SS und McKeon F (1997): Kinetochore localization of murine Bub1 is required for normal mitotic timing and checkpoint response to spindle damage. *Cell*, 89 (5) 727-35.
- Taylor SS, Ha E und McKeon F (1998): The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *J Cell Biol*, 142 (1) 1-11.
- Taylor SS, Hussein D, Wang Y, Elderkin S und Morrow CJ (2001): Kinetochore localisation and phosphorylation of the mitotic checkpoint components Bub1 and BubR1 are differentially regulated by spindle events in human cells. *J Cell Sci*, 114 (Pt 24) 4385-95.
- Taylor SS, Scott MIF und Holland AJ (2004): The spindle checkpoint: a quality control mechanism which ensures accurate chromosome segregation. *Chromosome Res*, 12 (6) 599-616.
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76 (9) 4350-4.
- Vader G, Medema RH und Lens SMA (2006): The chromosomal passenger complex: guiding Aurora-B through mitosis. *J Cell Biol*, 173 (6) 833-7.
- van Vugt MATM und Medema RH (2005): Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. *Oncogene*, 24 (17) 2844-59.
- Vigneron S, Prieto S, Bernis C, Labbe J, Castro A und Lorca T (2004): Kinetochore localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell*, 15 (10) 4584-96.
- Vogel C (2008): The role of mitotic spindle checkpoint in chemotherapy-induced apoptosis, Inauguraldissertation der Philipps-Universität Marburg, FB Medizin.
- Vogel C, Hager C und Bastians H (2007): Mechanisms of mitotic cell death induced by chemotherapy-mediated G2 checkpoint abrogation. *Cancer Res*, 67 (1) 339-45.
- Vogel C, Kienitz A, Hofmann I, Muller R und Bastians H (2004): Crosstalk of the mitotic spindle assembly checkpoint with p53 to prevent polyploidy. *Oncogene*, 23 (41) 6845-53.
- Waizenegger IC, Hauf S, Meinke A und Peters JM (2000): Two distinct pathways remove mammalian cohesin from chromosome arms in prophase and from centromeres in anaphase. *Cell*, 103 (3) 399-410.
- Walther A, Houlston R und Tomlinson I (2008): Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: a meta-analysis. *Gut*, 57 (7) 941-50.
- WHO (2006) Fact sheet N°297 "Cancer" aufgerufen am: 02.01.2008
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>
- Winey M, Goetsch L, Baum P und Byers B (1991): MPS1 and MPS2: novel yeast genes defining distinct steps of spindle pole body duplication. *J Cell Biol*, 114 (4) 745-54.
- Yu Q, La Rose J, Zhang H, Takemura H, Kohn KW und Pommier Y (2002): UCN-01 inhibits p53 up-regulation and abrogates gamma-radiation-induced G(2)-M checkpoint independently of p53 by targeting both of the checkpoint kinases, Chk2 and Chk1. *Cancer Res*, 62 (20) 5743-8.
- Zachos G, Black EJ, Walker M, Scott MT, Vagnarelli P, Earnshaw WC und Gillespie DAF (2007): Chk1 is required for spindle checkpoint function. *Dev Cell*, 12 (2) 247-60.
- Zhao Y und Chen R (2006): Mps1 phosphorylation by MAP kinase is required for kinetochore localization of spindle-checkpoint proteins. *Curr Biol*, 16 (17) 1764-9.

Danksagung

Für die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Molekularbiologie und Tumorforschung danke ich Prof. Dr. Rolf Müller.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Holger Bastians für die interessante Aufgabensstellung und vielfältige Unterstützung während meiner Labortätigkeit, sowie für stetige Diskussionsbereitschaft.

Für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe Bastians und bei der Arbeitsgruppe Krebber. Hervorheben möchte ich Anne Kienitz, die mich sehr gut angeleitet und mich während meiner Laborarbeit mit vielen guten Ratschlägen begleitet hat. Des Weiteren danke ich Dr. Celia Vogel für eine kollegiale Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei denen bedanken, die mein Manuskript gelesen und konstruktive Kritik geübt haben: Anne Kienitz, Dr. Celia Vogel, Alexandra Hackmann, Christian Schneider und Adelheid Grodd.

Meinen Eltern Adelheid und Dietrich Grodd danke ich, dass sie mir das Studium der Medizin ermöglicht und mich zur Promotion ermutigt haben.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Adamkiewicz, Bartsch, Barth, Basler, Bastians, Baum, Dettmeyer, Eilers, Feuser, Gress, Grundmann, Jungclas, Herrmann-Lingen, Hertl, Hilt, Klose, Koolman, Lang, Lill, Lohoff, Maier, Mandrek, Martin, Moll, Müller, Mutters, Oertl, Pieper, Plant, Renz, Ruchholtz, Schäfer, Schmidt, Seitz, Wagner, Wennemuth, Westermann, Wulf.

